

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 63



9-10'2018

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

Корректор: А. Н. Лобусева

Сайт: www.jantchem.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 8-499-611-20-77

Факс: 8-499-611-42-38

E-mail: gncajournal@yandex.ru

А. И. Гусак

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

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

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

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

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

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2018

Типография:

ООО «Литера»

Дата выхода: 2018

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 63

9—10'2018

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

Зам. главного редактора — к. м. н. Буданов С. В.

Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Проф., д. м. н. Белобородов В. А.

Проф. Говорун В. М.

Проф. Гомберг М. А.

Д. б. н. Даниленко В. Н.

Проф. Климко Н. Н.

Проф., д. м. н. Кочеровец В. И.

Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.

Проф., д. м. н. Никитин А. В.

Проф. Руднов В. А.

Проф. Тишков В. Н.

Проф., д. б. н. Фирсов А. А.

Проф., д. м. н. Хрянин А. А.

Проф., д. м. н. Яковлев С. В.

Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

к.м.н. Кузнецова С. М.

к.б.н. Бежавская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.

Бибикова М. В.

Васильев А. Н.

Волжанин В. М.

Дмитриева Н. В.

Долгова Г. В.

Захарова Ю. А.

Зуева Л. П.

Ильина Е. Н.

Клясова Г. А.

Ленёва И. А.

Митрохин С. Д.

Романцов М. Г.

Сычев Д. А.

Тең В. В.

Цыбанев А. 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

Original Papers

- Громоных Т. И., Гаврюшина И. А., Садыкова В. С.,
Фельдман Н. Б., Дмитренко А. С.,
Айрапетова А. Ю., Луценко С. В.
Получение иммобилизованного мицелия базидиомицета
Fomitopsis Officinalis (vill.:fr.) Bond. Et sing.
продуцента агаричиновой кислоты
Новикова В. В., Гейн В. Л.
Углублённое исследование противогрибковой активности
соединений ряда серебряных солей
пиразол-3-карбоксамидов
Логинова С. Я., Шуккина В. Н., Борисевич Г. В.,
Суровяткина И. В., Борисевич С. В.
Изучение активности противовирусных препаратов
в отношении возбудителя лихорадки Зика
в культуре клеток

- 3 Gromovych T. I., Gavryushina I. A., Sadykova V. S.,
Feldman N. B., Dmitrenok A. S.,
Ayrapetova A. Yu., Lutsenko S. V.
Obtaining Immobilized Mycelium of Basidiomycete
Fomitopsis Officinalis (Vill.:Fr.) Bond. Et Sing.,
Producer of Agaricic Acid
10 Novikova V. V., Gein V. L.
In-Depth Study of the Antifungal Activity
of Compounds of a Number
of Pyrazol-3-Carboxamide Silver Salts
14 Loginova S. Ya., Shchukina V. N., Borisevich G. V.,
Surovyatkina I. V., Borisevich S. V.
The Study of Antiviral Drugs' Activity Against
The Causative Agent of Zika Fever
in Cell Culture

В помощь практикующему врачу

Guidelines for Practitioners

- Карпов И. А., Соловей Н. В.
Рациональная этиотропная терапия инфекций
верхних дыхательных путей. Проблемы резистентности
внебольничных микроорганизмов
Коломиец В. М., Рублева Н. В.,
Коваленко А. Л., Таликова Е. В.
Иммуномодулирующая терапия сопровождения
при лечении больных запущенным туберкулёзом
Сереброва С. Ю., Прокофьев А. Б., Еременко Н. Н.,
Журавлева М. В., Александрова Т. А.
Клинико-фармакологические аспекты резистентности
к эрадикационной терапии инфекции *Helicobacter pylori*
Морозова Т. Е., Лукина М. В.,
Андрущишина Т. Б., Чукина М. А.
Анализ эффективности, рациональности и безопасности
периоперационной профилактики у пациентов
хирургического профиля в многопрофильном стационаре
Данилов А. И., Козлов Р. С., Козлов С. Н.,
Дехнич А. В., Жаркова Л. П.
Особенности антимикробной терапии инфекционного
эндокардита в Российской Федерации

- 19 Karpov I. A., Solovey N. V.
Rational Etiotropic Treatment of Upper Respiratory Tract
Infections. Problems of Antibiotic Resistance
of Community-Acquired Infections
26 Kolomiets V. M., Rubleva N. V.,
Kovalenko A. L., Talikova E. V.
Accompanying Immunomodulatory Therapy
in Treatment of Patients with Neglected Tuberculosis
31 Serebrova S. Yu., Prokofiev A. B., Eremenko N. N.,
Zhuravleva M. V., Alexandrova T. A.
Clinical and Pharmacological Aspects of Resistance
to Eradication Therapy of *Helicobacter Pylori* Infection
39 Morozova T. E., Lukina M. V.,
Andrushchishina T. B., Chukina M. A.
Analysis of the Effectiveness, Efficiency, and Safety
of Perioperative Prophylaxis in Surgical Patients
in a Multidisciplinary Hospital
48 Danilov A. I., Kozlov R. S., Kozlov S. N.,
Dekhnich A. V., Zharkova L. P.
Features of Antimicrobial Therapy of Infective Endocarditis
in the Russian Federation

Стандартизация и контроль
лекарственных средствStandardization and Control
of Medicinal Products

- Чапленко А. А., Мельникова Е. В.,
Рачинская О. А., Олефир Ю. В.
Оценка активности препаратов, содержащих
клеточные линии человека: перспективные подходы
и требования регуляторных органов

- 53 Chaplenko A. A., Melnikova E. V.,
Rachinskaya O. A., Olefir Yu. V.
Evaluation of the Activity of Drugs Containing
Human Cell Lines: Promising Approaches
and Requirements of Regulatory Bodies

Обзоры

Reviews

- Стеценко В. В., Ефимочкина Н. Р.
Механизмы формирования антибиотикорезистентности
бактерий рода *Campylobacter*
Хильченко С. Р., Запорожец Т. С., Звягинцева Т. Н.,
Шевченко Н. М., Беседнова Н. Н.
Фукоиданы бурых водорослей:
влияние элементов молекулярной архитектуры
на функциональную активность

- 61 Stetsenko V. V., Efimochkina N. R.
The Mechanisms of Antibiotic Resistance
in Bacteria of The Genus *Campylobacter*
69 Khilchenko S. R., Zaporozhets T. S., Zvyagintseva T. N.,
Shevchenko N. M., Besednova N. N.
Fucoidans from Brown Algae: the Influence
of Molecular Architecture Features
on Functional Activity

* 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.

Получение иммобилизованного мицелия базидиомицета *Fomitopsis Officinalis* (vill.:fr.) Bond. Et sing. продуцента агарициновой кислоты

*Т. И. ГРОМОВЫХ¹, И. А. ГАВРЮШИНА^{1,2}, В. С. САДЫКОВА², Н. Б. ФЕЛЬДМАН¹,
А. С. ДМИТРЕНОК³, А. Ю. АЙРАПЕТОВА⁴, С. В. ЛУЦЕНКО¹

¹ Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

² НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

³ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского, Москва

⁴ Пятигорский филиал Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава России, Пятигорск

Obtaining Immobilized Mycelium of Basidiomycete *Fomitopsis Officinalis* (Vill.:Fr.) Bond. Et Sing., Producer of Agaricic Acid

* T. I. GROMOVYKH¹, I. A. GAVRYUSHINA^{1,2}, V. S. SADYKOVA², N. B. FELDMAN¹,
A. S. DMITRENOK³, A. YU. AYRAPETOVA⁴, S. V. LUTSENKO¹

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

² Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

³ N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow

⁴ Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd Medical State University, Pyatigorsk

Статья посвящена разработке нового способа получения мицелия базидиомицета *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bond. Et Sing., иммобилизованного на матрице бактериальной целлюлозы. Мицелий трутовика лекарственного содержит биологически активные соединения, важнейшим из которых является агарициновая кислота. Известные способы получения мицелия путём поверхностного твёрдофазного и погруженного культивирования позволяют получать биомассу мицелия в количестве от 3,5 до 5 г/л абсолютно сухой массы. Учитывая то, что *F. officinalis* является ксилотрофным макромицетом, использование целлюлозы в качестве источника питания может показать более высокую продуктивность при культивировании мицелия в искусственных биотехнологических системах. Цель работы — получение иммобилизованного мицелия путём совместного культивирования *F. officinalis* с продуцентом бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii*. Установлено, что при совместном культивировании базидиального штамма *F. officinalis* со штаммом-продуцентом бактериальной целлюлозы *G. hansenii* продуктивность увеличивается на синтетической среде H5/1 в 3,2 раза, а на натуральной среде Maltax-10 (концентрация 5%) — в 1,9 раза. Полученный иммобилизованный мицелий *F. officinalis* содержит агарициновую кислоту, количество которой составляет 5,4—6,8%. Изучение структуры агарициновой кислоты, выделенной из мицелия штамма, было проведено путём сравнения спектров ЯМР ¹³C со спектрами стандартного образца (Sigma cat). Результаты исследований подтвердили идентичность соединений.

Ключевые слова: *Fomitopsis officinalis*, ксилотрофный базидиомицет, биотехнология, иммобилизованный мицелий, бактериальная целлюлоза, агарициновая кислота, *Gluconacetobacter hansenii*.

The article describes the development of a new method for obtaining mycelium of the basidiomycete *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bond. Et Sing., immobilized on a matrix of bacterial cellulose. Mycelium of *F. officinalis* contains biologically active compounds, the most important of which is agaricic acid. The known methods for producing mycelium using surface solid-phase and submerged cultivation make it possible to obtain biomass of mycelium in an amount of 3.5 to 5 g/L of absolutely dry mass. Considering that *F. officinalis* is a xylotrophic macromycete, the use of cellulose as a food source can show higher productivity in the cultivation of mycelium in artificial biotechnological systems. The aim of the work was to obtain immobilized mycelium by co-cultivation of *F. officinalis* with the producer of bacterial cellulose *Gluconacetobacter hansenii*. The research established that with the co-cultivation of the basidial strain of *F. officinalis* with *G. hansenii*, the producer strain of bacterial cellulose, the productivity increases by 3.2 times on synthetic medium H5/1 and on the natural medium Maltax-10 (5% concentration) — by 1.9 times. The obtained immobilized mycelium of *F. officinalis* contains agaricic acid, the amount of which is 5.4—6.8%. The study of the structure of agaricic acid, isolated from the mycelium of the strain, was carried out by comparing the ¹³C NMR spectra with the spectra of a standard sample (Sigma cat). The results of the research confirmed the identity of the compounds.

Keywords: *Fomitopsis officinalis*, xylotrophic basidiomycete, biotechnology, immobilized mycelium, bacterial cellulose, agaricic acid, *Gluconacetobacter hansenii*.

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции:

E-mail: gromovykhtatiana@mail.ru

Введение

Ксилотрофный базидиомицет *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bond. Et Sing., известный как трутовик лекарственный или лиственничная губка, долгие годы применяется как природный источник лекарственных средств. В медицинской практике применяются плодовые тела для получения препаратов, оказывающих слабительное, кровоостанавливающее действие и для уменьшения потоотделения у туберкулёзных больных. В плодовых телах гриба *F. officinalis* содержится агарциновая, эбуриколовая, фумаровая, рициноловая, лимонная и яблочная органические кислоты; d-глюкозамин; биофлавоноиды, витамины группы В, Р, Е, А, эфирные масла, фитостерин, глюкоза и маннит [1, 2].

В результате исследований плодовых тел трутовика лекарственного [3, 4] были получены углекислотные экстракты, которые содержали агарциновую кислоту и липидно-каротиноидный комплекс, биофлавоноиды и витамин К. В водном экстракте получены углеводы, часть дубильных веществ и витамины В₁, В₂, В₆, Р [5, 6]. В плодовом теле этого трутовика был выделен полисахарид «ланofil», который стимулирует биосинтез ферментов, участвующих в восстановлении нарушенного обмена веществ клетками печени и расщепления глюкозы и жиров в организме.

В настоящее время известно, что естественные ресурсы вида *F. officinalis* уже истощены, поэтому его, как редкий исчезающий вид грибов, планируют включить в Красную книгу России. Поиск новых источников для получения лекарственных препаратов на основе мицелия *F. officinalis* является одной из приоритетных задач ресурсосберегающих технологий, стоящих перед отечественной наукой «Химический и биологический синтез лекарственных средств и пищевых продуктов» (Постановление Правительства РФ N 2727/п-П8 от 21 июля 1996 г.).

Биологически активные вещества *F. officinalis* содержатся не только в базидиомах, но и в вегетативном мицелии, получаемом путём жидкофазного и твердофазного культивирования. Важным преимуществом получения биомассы мицелия *F. officinalis* с помощью биотехнологических методов являются: неограниченная возможность и безотходность производства препаратов, не дефицитность сырьевых ресурсов.

Для получения мицелия трутовика лекарственного необходим подбор продуцентов, имеющих высокую скорость роста и способных расти в условиях жидкофазного культивирования. До настоящего времени уже предложены штаммы *F. officinalis*, проявляющие антибактериальную и противоопухолевую активность [6, 7]. Известно, что мицелий ксилотрофных базидиомицетов трудно культивируется в условиях жидкофазного

культивирования, но лучше растёт на твёрдых субстратах. При культивировании продуцентов *F. officinalis* на твёрдых растительных субстратах возникает проблема отделения биомассы мицелия от растительных остатков, в связи с чем такую биомассу целесообразно использовать только в кормовых целях [9].

Авторами [9, 10] показано, что скорость роста мицелия лиственничной губки на различных натуральных, комплексных и синтетических агаризованных средах относительно невелика (средняя суточная скорость линейного роста составляет 2–4 мм). Для получения инокулюма требуется 12–14 дней, а посевного мицелия на твердых субстратах — около 20 сут. Однако эта величина не является постоянной. Она изменяется не равномерно, в зависимости от возраста культуры и состава среды.

Продуктивность биомассы мицелия базидиомицетов в условиях жидкофазного культивирования составляет до 5 г/л абсолютно сухого вещества (а.с.в.). Поэтому до настоящего времени не налажено крупнотоннажное производство мицелия продуцентов этого вида. Для получения пищевых и фармацевтических препаратов на основе мицелия штаммов *F. officinalis* необходимо разработать принципиально новые подходы к способам культивирования, обеспечивающие получение чистого продукта без примесей растительных остатков.

Бактериальная целлюлоза является наноматериалом, имеющим микропоры размером от 5×10 до 50×100 нм, на котором хорошо иммобилизуются клетки прокариот и эукариот [11, 12]. Кроме того, она нетоксична, обладает высокими адсорбционными свойствами, является биоразлагаемым и биосовместимым полимером. Учитывая то, что *F. officinalis* является ксилотрофным макромицетом, использование целлюлозы в качестве источника питания может показать более высокую продуктивность при культивировании мицелия в искусственных биотехнологических системах. Это и послужило основой для предпринятого исследования.

Цель работы — получение иммобилизованного мицелия путём совместного культивирования *F. officinalis* с продуцентом бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii*.

Материал и методы

Получение мицелия и матриц для иммобилизации проводили с использованием штаммов: *Fomitopsis officinalis* Тув-2006 (ВКПМ F-906) — ксилотрофного базидиомицета и *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-1054) — продуцента бактериальной целлюлозы [10, 14]. Иммобилизацию мицелия проводили при совместном культивировании базидиального гриба *Fomitopsis officinalis* со штаммом-продуцентом бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* в двух вариантах: на синтетической среде состава, г/л: глюкоза — 7,0, дрожжевой экстракт — 5,0, Na₂HPO₄ — 0,27,

K_2HPO_4 — 0,2, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,3, моногидрат лимонной кислоты — 0,115, pH среды 6,5 и на натуральной среде Мальтакс-10 (5%). Культивирование проводили в течение 30 сут. при температуре $28 \pm 2^\circ C$. Посевной материал продуцента *G.hansenii* выращивали при перемешивании 120 об/мин в течение 5 сут. на жидкой среде Н5 следующего состава, г/л: глюкоза — 70,0, дрожжевой экстракт — 5,0, Na_2HPO_4 — 2,7, K_2HPO_4 — 2,0, $(NH_4)_2SO_4$ — 3,0, моногидрат лимонной кислоты — 1,15, спирт — 5,0, pH = 4,0.

Посев инокулята штамма *G.hansenii* проводили суспензией с титром 10^6 КОЕ/мл в объёме 10 см³. Посевной материал продуцента *F.officinalis* выращивали на агаровой среде Maltax-10 в концентрации 5 %. Посев проводили агаровым блоком газонной культуры мицелия *F.officinalis* размером $10 \times 10 \times 5$ мм³. Через 48 ч в колбы вносили инокулят агарового блока площадью 1 см² мицелия *F.officinalis* и культивировали смешанную культуру в течение 30 сут. в термостате при температуре $30 \pm 1^\circ C$.

Полученные плёнки иммобилизованного мицелия *F.officinalis* на матрице бактериальной целлюлозы отделяли от культуральной жидкости, высушивали в сухожаровом шкафу при $t = 60^\circ C$ до постоянной массы (рис. 1). Содержание белка в мицелии базидиомицета *Fomitopsis officinalis*, полученного как в монокультуре, так и на матрице бактериальной целлюлозы, определяли методом Брэдфорда [13].

Продуктивность мицелия рассчитывали по количеству белка в образцах иммобилизованного мицелия на бактериальной целлюлозе следующим образом:

$$A = B \times 100 / C, \text{ где}$$

A — количество мицелия в образце, %, **B** — количество белка в образце мицелия, полученном в монокультуре, %; **C** — количество белка в иммобилизованном мицелии на бактериальной целлюлозе, полученного в смешанной культуре.

Определение агарациновой кислоты в мицелии проводили, согласно методу, разработанному авторами [14]. Идентичность белкового состава образцов мицелия подтверждали методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [15]. Идентификацию и определение концентрации агарациновой кислоты в пробах проводили с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ. Пробы агарациновой кислоты растворяли в 1000 мкл этанола, перемешивали, центрифугировали и отбирали по 20 мкл супернатанта для ВЭЖХ-анализа. Анализ проводили с помощью хроматографа Agilent Technologies 1260 Infinity (USA) на колонке C18 для обращённо-фазовой хроматографии, при скорости потока 1 мл/мин. Подвижная фаза состояла из смеси ацетонитрила и трихлоруксусной кислоты (0,1%, v/v). Элюат с колонки мониторировали при длине волны 206 нм. Концентрацию агарациновой кислоты в пробах определяли по калибровочному графику, построенному с помощью её стандартного образца (Sigma Chemicals Co., США).

Подтверждение структуры агарациновой кислоты, выделенной из мицелия штамма, было проведено путём сравнения спектров ЯМР ¹³C со спектрами стандартного образца (Sigma cat). ЯМР спектры регистрировались на спектрометре Bruker AV600. Для получения спектров ЯМР использовали стандартную импульсную последовательность. Химические сдвиги ЯМР сигналов определяли относительно сигнала остаточных протонов соответствующего дейтерорастворителя (ДМСО).

Результаты и обсуждение

В результате проведённых исследований установлено, что базидиомицет *F.officinalis* хорошо растёт как в монокультуре, так и совместно с продуцентом бактериальной целлюлозы на натуральной и синтетической средах. На 20-е сутки культивирования в чистой и смешанной культурах продуцент *F.officinalis* формирует плёнки, кото-

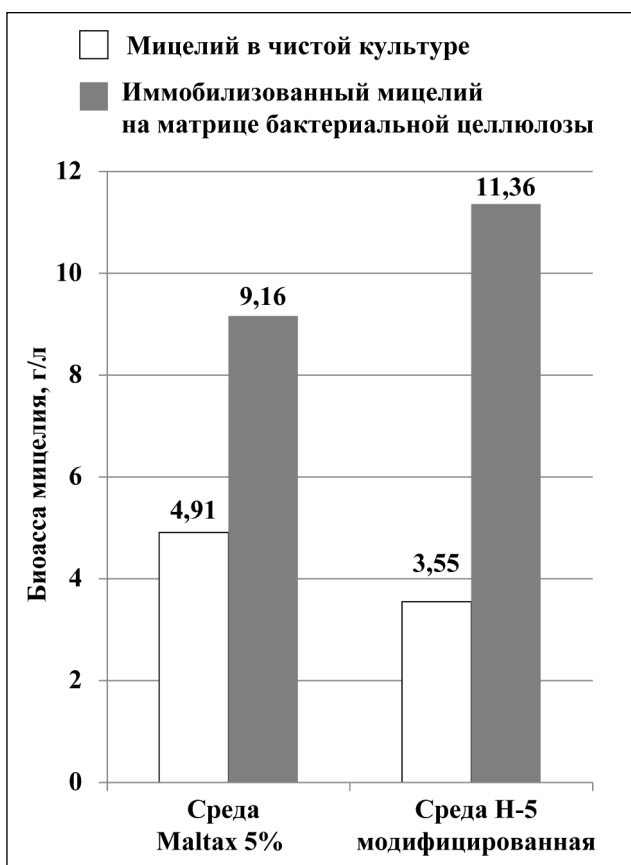


Рис. 1. Количество биомассы мицелия *Fomitopsis officinalis*, полученного при культивировании в монокультуре и совместно с продуцентом *Gluconacetobacter hansenii* на 30-е сутки культивирования

рые визуально не различаются на натуральной и синтетической средах. Воздушный мицелий более обильный на натуральной среде, однако плотность плёнок и биомасса были выше на синтетической среде.

Следует отметить, что плёнки, полученные при культивировании чистой культуры *F.officinalis* были более рыхлые, рассыпающиеся при высушивании.

Исследования показали, что биомасса мицелия *F.officinalis* в смешанной культуре на среде Maltax составляла 9,2 г/л, что выше в 1,9 раза, чем при культивировании его в чистой культуре. Биомасса мицелия *F.officinalis*, полученного в смешанной культуре на синтетической среде была ещё выше и составляла — 11,4 г/л, что выше, чем при культивировании в чистой культуре в 3,2 раза (рис. 1). Доля иммобилизованного мицелия в образцах, рассчитанная по количеству белка, составляла в биомассе, полученной на среде Maltax — 85,5, а на среде Н5 — 80,8 % (рис. 2).

Среднесуточная продуктивность мицелия *F.officinalis* при росте в чистой культуре составляла 0,12 г/л×сут, в смешанной культуре — 0,38 г/л×сут. Следовательно, повышение выхода и продуктивно-

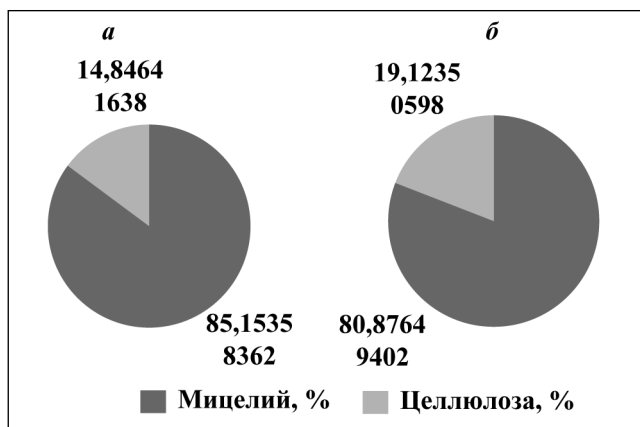


Рис. 2. Доля иммобилизованного мицелия *F.officinalis* на матрице бактериальной целлюлозы при стационарном культивировании.

а — Соотношение мицелия *F.officinalis* и целлюлозы при стационарном культивировании на среде Maltax, 5%; б — Соотношение мицелия *F.officinalis* и целлюлозы при стационарном культивировании на модифицированной среде Н-5.

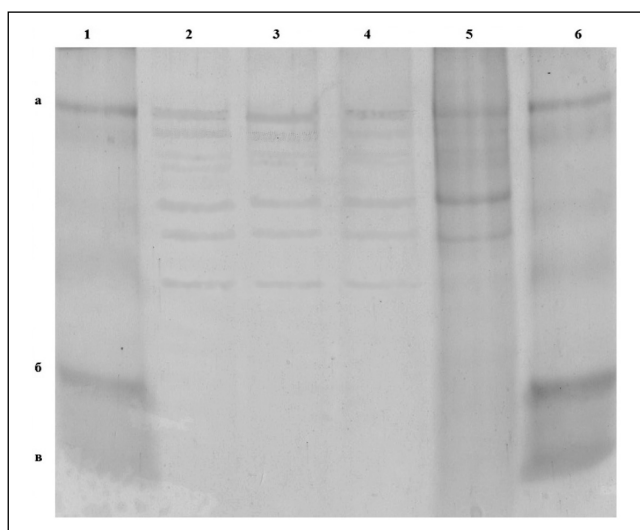


Рис. 3. Гель-электрофорез белков из экстрактов мицелия штамма *F.officinalis*, полученного в различных условиях культивирования.

2 — *F.officinalis* на среде Maltax, 5%; 3 — иммобилизованный мицелий *F.officinalis* на матрице бактериальной целлюлозы (среда Maltax, 5%); 4 — иммобилизованный мицелий *F.officinalis* на матрице бактериальной целлюлозы (синтетическая среда); 5 — *F.officinalis* на синтетической среде; 1, 6 — маркеры молекулярной массы. а — бычий сывороточный альбумин (Мм = 67000 Да); б — химотрипсиноген А (Мм = 25000 Да); в — рибонуклеаза А (13700 Да).

Количество агарициновой кислоты в образцах мицелия *Fomitopsis officinalis*, полученного при культивировании в монокультуре и на матрице бактериальной целлюлозы при совместном культивировании с продуцентом *Gluconacetobacter hansenii*

Бактериальная целлюлоза	Количество агарициновой кислоты в образцах, %			
	Мицелий в чистой культуре <i>F.officinalis</i> на среде Maltax	Мицелий в чистой культуре <i>F.officinalis</i> на синтетической среде	Иммобилизованный мицелий <i>F.officinalis</i> , среда Maltax	Иммобилизованный мицелий <i>F.officinalis</i> , синтетическая среда
0	7,3±0,5	7,1±0,5	5,6±0,4	6,8±0,4

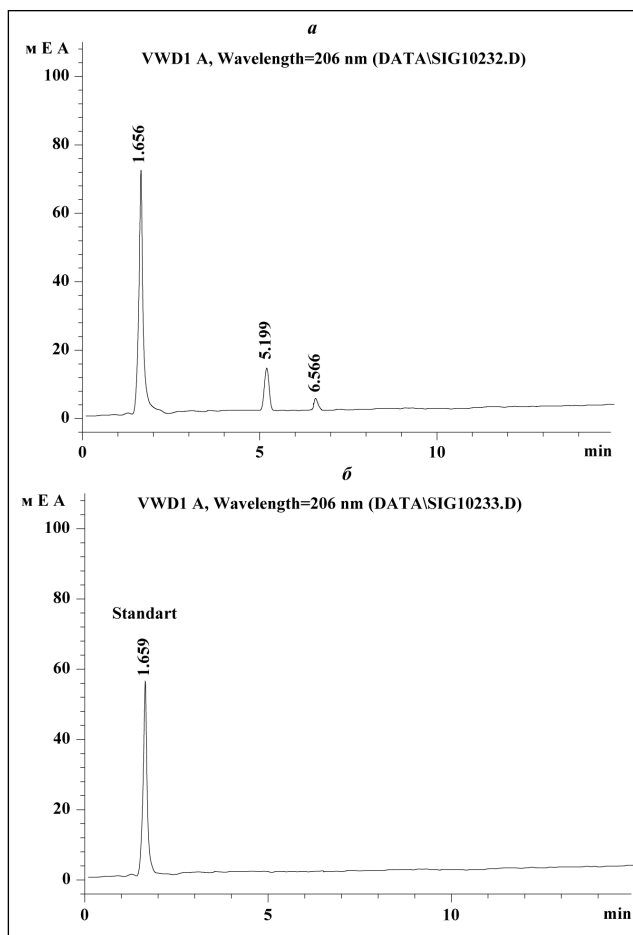


Рис. 4. Спектры хроматографического анализа препарата агарициновой кислоты методом ОФ ВЭЖХ.

а — препарат агарициновой кислоты из мицелия *Fomitopsis officinalis*; б — стандартный образец агарициновой кислоты (Sigma-Aldrich).

сти мицелия достигается при совместном способе культивирования базидиального гриба *F.officinalis* и продуцента бактериальной целлюлозы штамма *G.hansenii*, выращиваемых на синтетической среде.

Убедительно доказывают наличие продуцента *F.officinalis* на матрице бактериальной целлюлозы результаты проведенного электрофореза молекулярной массы белков экстрактов, полученных из образцов биомасс мицелия. Приведенные результаты доказывают идентичность белкового состава исследуемых образцов мицелия, полученного в монокультуре и иммобилизованного на бактериальной целлюлозе (рис. 3).

Количество агарициновой кислоты в образ-

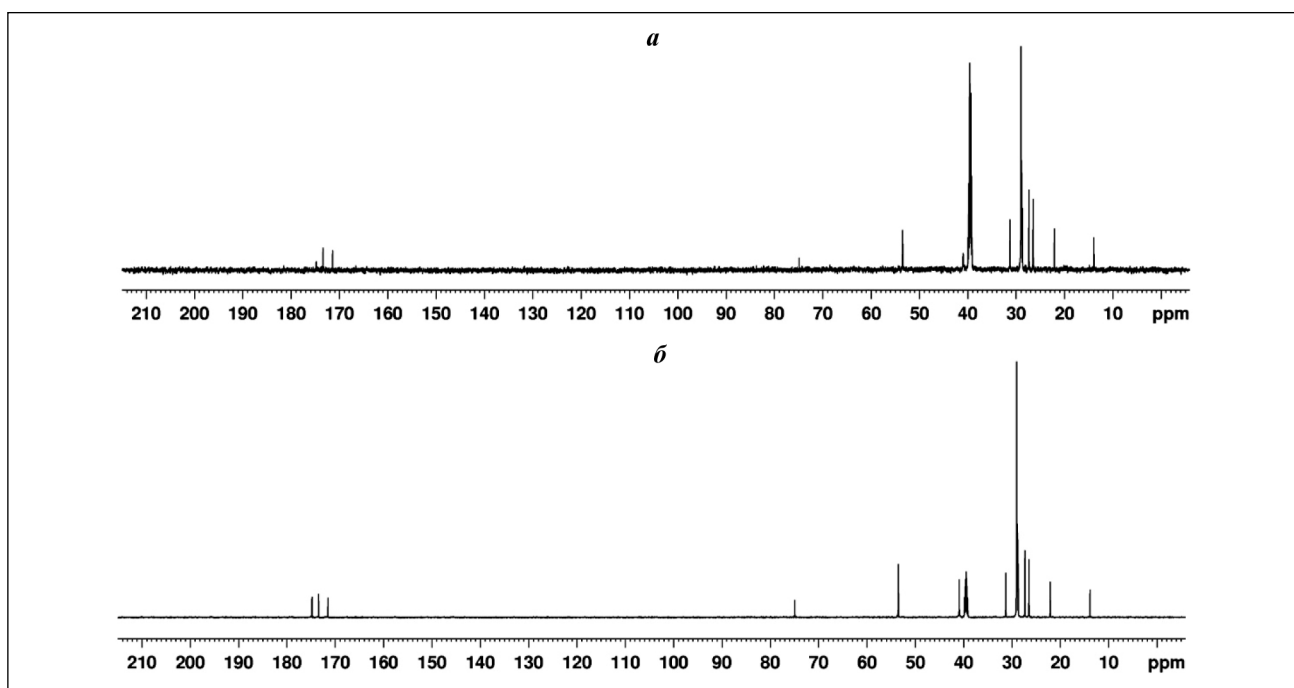


Рис. 5. ЯМР-спектры стандарта агарициновой кислоты (а) и выделенного вещества (б).

цах, полученных при совместном и монокультивировании с *Gluconacetobacter hansenii* показано в таблице. Как показали результаты, на синтетической среде в иммобилизованном мицелии *F.officinalis* содержится больше агарициновой кислоты, следовательно, такой способ культивирования проводить целесообразно.

Результаты хроматографического анализа выделенной агарициновой кислоты показали, что при 206 нм отмечается пик агарициновой кислоты как в опытном полученном из иммобилизованного мицелия на средах Н5 и Maltax (смешанный образец), так и в стандартном образцах. Время удерживания на обращённо-фазовой колонке содержащейся в пробах агарициновой кислоты, было идентично времени удерживания её стандартного образца (Sigma Chemicals Co., США) (рис. 4).

Анализ ЯМР-спектров подтвердил идентичность спектров образцов, полученных из мицелия и стандартного образца агарициновой кислоты (рис. 5).

Ксилотрофные базидиомицеты в последние десятилетия привлекают внимание в качестве объектов биотехнологии. Исследователи уже пришли к пониманию значения научно-практических разработок по установлению сходства между химическим составом природных плодовых тел и культуральным мицелием, выращенным на селективных питательных средах. Признано, что использование именно быстро нарастаемого мицелия (например, глубинного) для получения ценных метаболитов в большинстве случа-

ев выгоднее и удобнее, чем использование плодовых тел [16—18]. Сделаны попытки по улучшению таких важных показателей культивируемого мицелия, как содержание белка, отдельных аминокислот и других биологически активных соединений путём варьирования условий культивирования продуцентов [18—20]. Многие авторы изучали особенности биохимии и физиологии видов базидиомицетов-продуцентов, в основном, при культивировании чистых культур [21—26]. Однако отсутствуют сведения о предпринятых попытках культивирования мицелия базидиальных ксилотрофных макромицетов с прокариотами, синтезирующими полимеры.

К числу наиболее существенных факторов, оказывающих влияние на проявление ценных свойств микроорганизмов, относятся: состав среды, концентрация протонов водорода, редокс-потенциал, температура культивирования, а также методы совместного выращивания двух или большего числа видов микроорганизмов [27]. Согласно анализу, проведённому А. С. Бухало [26, 28, 29], высшие базидиомицеты в культуре предпочитают сахара другим источникам углерода, в частности, такие как глюкоза, фруктоза, ксилоза, мальтоза и целлобиоза [30, 31]. Другими авторами отмечено также, что лучшим для роста гриба и синтеза ими полисахаридов является крахмал [32].

Древоразрушающие базидиомицеты в природе принимают участие в разложении целлюлозы и хорошо используют этот высокомолекулярный углевод при искусственном культивировании. Многие виды активно растут на среде с фильтро-

вальной бумагой в качестве единственного источника углерода. Наиболее высокой активностью целлюлозолитических ферментов характеризуются виды, приуроченные в природе к целлюлозосодержащим субстратам: *Panus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Crinipellis schevczenkovi* и *Armillarieila mellea* [26, 28]. Сведения об использовании целлюлозы в качестве единственного источника углерода штаммами *F. officinalis* малочисленны. В наших исследованиях показано, что на натуральной среде мальтакса, где основным источником углерода являются мальтоза и глюкоза, продуктивность была ниже в 1,9 раза при культивировании монокультуры штамма *F. officinalis*, чем при культивировании с продуцентом бактериальной целлюлозы; на синтетической среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу, продуктивность штамма также была ниже, чем при совместном культиви-

ровании с *G. hansenii*, поставляющим целлюлозу ксилотрофному продуценту. При совместном культивировании *F. officinalis* и *G. hansenii* максимальная продуктивность составляла 11,36 г/л абсолютно сухого веса.

В условиях совместного культивирования штаммов *F. officinalis* и *G. hansenii* базидиомицет синтезирует агарациновую кислоту в количестве 5,8 и 6,4%, что сопоставимо с таковым количественным показателем в биомассе мицелия, полученного при культивировании чистой культуры. Таким образом, культивирование *F. officinalis* и *G. hansenii* позволяет получать иммобилизованный мицелий на бактериальной целлюлозе, с большей продуктивностью, что перспективно для разработки биотехнологии агарациновой кислоты и других биологически активных соединений, содержащихся в биомассе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feng W., Yang J. S. A new drimaneses uiterpenoid and a new triterpene lactone from fungus of *Fomes officinalis*. J Asian Nat Prod Res 2015; 17 (11): 1065–1072.
2. Wu H.T., Lu F.H., Su Y.C., Ou H.Y., Hung H.C., Wu J.S., Yang Y.C., Chang C. J. In vivo and in vitro antitumor effects of fungal extracts. Molecules 2014 Feb 21; 19 (2): 2546–2556.
3. Han J., Li L., Zhong J., Tohtaton Z., Ren Q., Han L., Huang X., Yuan T. Officialonic acids A-H, lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Fomes officinalis*. Phytochemistry 2016 Oct; 130: 193–200.
4. Feng W., Yang J., Xu X., Liu Q. Quantitative determination of lanostane triterpenes in *Fomes officinalis* and their fragmentation study by HPLC-ESI. Phytochem Anal 2010 Nov-Dec; 21 (6): 531–538.
5. Патент РФ №2257222. Комплексная переработка гриба трутовика лекарственного (*Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. EtSing.). Канзай В.И., Ушанова В.М., Ооржак У.С. опубл. 27.07.2005, бюл. № 2.1. / Patent RF №2257222. Kompleksnaya pererabotka griba trutovika lekarstvennogo (*Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. EtSing.). Kanzay V.I., Ushanova V.M., Oorzhak U.S. opubl. 27.07.2005, byul. № 2.1/ [in Russian]
6. Патент РФ № 2375439. Штамм базидиального гриба *Fomitopsis officinalis*, проявляющий антибактериальную активность в отношении бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*. Сидоренко М.Л., Бузалева Л.С., Ефремова Н.Ю., Булах Е.М. опубл. 10.12.2009 г. / Patent RF № 2375439. Shtamm bazidial'nogo griba *Fomitopsis officinalis*, proyavlyayushchiy antibakterial'nuyu aktivnost' v otnoshenii bakteriy *Yersinia pseudotuberculosis*. Sidorenko M.L., Buzoleva L.S., Efremova N.Yu., Bulakh E.M. opubl. 10.12.2009 g. [in Russian]
7. Сидоренко М.Н. Оценка возможности использования листовичной губки в качестве источника биологически активных веществ. Перспективы развития инноваций в биологии: Материалы Всероссийской научной школы для молодежи Владивосток, 2010, С. 99–103. / Sidorenko M.N. Otsenka vozmozhnosti ispol'zovaniya listvennichnoy gubki v kachestve istochnika biologicheskii aktivnykh veshchestv. Perspektivy razvitiya innovatsiy v biologii: Materialy Vserossiyskoy nauchnoy shkoly dlya molodezhi Vladivostok: 2010; 99–103. [in Russian]
8. Ильина Г.В., Ильин Д.Ю. Ксилотрофные базидиомицеты в чистой культуре. Пенза: РИО ПГСХА, 2013. — 224 с. / Il'ina G.V., Il'in D.Yu. Ksilotrofnye bazidiomitsety v chistoy kul'ture. Penza: RIO PGSKHA, 2013; 224. [in Russian]
9. Ковалева Г.К., Громовых Т.И. Биологические свойства и продуктивность нового штамма базидиомицета Тув-2006 *Fomitopsis officinalis* (Will.) Bond. Et Singer // Вестник КрасГАУ. — Красноярск, 2009. — №1. — С. — 68–75. / Kovaleva G.K., Gromovykh T.I. Biologicheskie svoystva i produktivnost' novogo shtamma bazidiomitseta Tyv-2006 *Fomitopsis officinalis* (Will.) Bond. Et Singer. Vestnik KrasGAU 2009; 1: 68–75. [in Russian]
10. Патент РФ. 2257222 C17 27.07.2005. Штамм базидиомицета *Fomitopsis* Тув-2006, используемый для получения противоопухолевых препаратов./ Громовых Т.И., Садыхова В.С., Ковалева Г. К., Черепанова Л.И., Инжеваткин Е.А. — Заявка 207 2007/1474 Приоритет от 17.12. 2007. зарег. 10 июля 2009. Опубликовано 10.07.2009 г. Бюлл. №19. — 7 с. / Patent RF. 2257222 C17 27.07.2005. Shtamm bazidiomitseta *Fomitopsis* Tyv-2006, ispol'zuemyy dlya polucheniya protivopukholevykh preparatov. Gromovykh T.I., Sadykova V.S., Kovaleva G. K., Cherepanova L.I., Inzhevatkin E.A. Opublikovano 10.07.2009 g. Byull. №19. — 7. [in Russian]
11. Gromovykh T.I., Sadykova V.S., Lutchenko S.V., Dmitrenok A.S., Feldman N.B., Danilchuk T.N., Kashirin V.V. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya 2017; 53: 1: 69–75;
12. Nimeskern L., Martínez Á. H., Sundberg J., Gatenholm P., Müller R., Stok K.S. Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement. J Mech Behav Biomed. — 2013. — 22: 12–21.
13. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding // Anal. Biochem. 1976; 72: 248–254.
14. Патент на изобретение № 2464307. Штамм бактерии *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 — продуцент бактериальной целлюлозы. Громовых Т.И., Данилчук Т.Н., Фан Ми Хань. Опубликовано 20.10.2012. Бюлл. № 29. / Patent na izobretenie № 2464307. Shtamm bakterii *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 — produtsent bakterial'noy tsellyulozy. Gromovykh T.I., Danilchuk T.N., Fan Mi Khan'. Opublikovano 20.10.2012. Byull. № 29. [in Russian]
15. Стручкова И.В., Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. Нижний Новгород: НГУ им Н.И. Лобачевского. 2012. — 60 с. / Struchkova I.V., Kal'yasova E.A. Teoreticheskie i prakticheskie osnovy provedeniya elektroforeza belkov v poliakrilamidnom gele. Nizhniy Novgorod: NGU im N.I. Lobachevskogo. 2012; 60. [in Russian]
16. Краснополяская Л.М., Автономова А.В., Леонтьева М.И. и др. Высокоэффективные способы погруженного культивирования ксилотрофных лекарственных — съедобных видов базидиальных грибов. Успехи медицинской микологии. — 2007. — Т. 9. — С. 243–245. / Krasnopol'skaya L.M., Avtonomova A.V., Leont'eva M.I. i dr. Vysokoeffektivnye sposoby pogruzhennogo kul'tivirovaniya ksilotrofnykh lekarstvenno — s'edobnykh vidov bazidial'nykh gribov. Uspekhi meditsinskoy mikologii 2007; 9: 243–245. [in Russian]
17. Автономова А.В., Краснополяская Л.М. Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства гриба бессмертия *Ganoderma lucidum*. Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. М.: 2007. — С. 216–224. / Avtonomova A.V., Krasnopol'skaya L.M. Protivoopukholevye i immunomoduliruyushchie svoystva griba bessmertiya *Ganoderma lucidum*. Netraditsionnye prirodnye resursy, innovatsionnye tekhnologii i produkty. M.: 2007; 216–224. [in Russian]
18. Дудка И.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. Киев, Изд-во «Наукова Думка». — 1983. — 313 с. / Dudka, I.A. Vysshie s'edobnye bazidiomitsety v poverkhnostnoy i glubinnoy kul'ture. Kiev, Izd-vo «Naukova Dumka». 1983; 313. [in Russian]
19. Ильина Г.В., Ильин Д.Ю. Ксилотрофные базидиомицеты в чистой культуре Пенза, изд-во ПГСХА. — 2013. — 223 с. / Il'ina G.V., Il'in D.Yu. Ksilotrofnye bizidiomitsety v chistoy kul'ture Penza, izd-vo PGSKHA 2013; 223. [in Russian]
20. Dijkstra F.Y. Studies on mushroom flavours I. Organoleptic significance of constituents of the cultivates mushroom, *Agaricus bisporus*.

- Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 1976; 160: 255—262. [in Russian]
21. **Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С.** Достижения и проблемы новой области биотехнологии: получение медицинских препаратов на основе биологически активных веществ мицелиальных грибов. Успехи медицинской микологии. — 2001. — Т. 1. — С. 254—256. / *Feofilova E.P., Tereshina V.M., Memorskaya A.S. Dostizheniya i problemy novoy oblasti biotekhnologii: polucheniye meditsinskikh preparatov na osnove biologicheskii aktivnykh veshchestv mitselial'nykh gribov. Uspekhi meditsinskoy mikologii* 2001; 1: 254—256. [in Russian]
 22. **Гарибова Л.В., Антимонова Л.А., Завьялова Л.А., Краснополяская Л.М.** Рост и морфологические признаки мицелия трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* в зависимости от условий культивирования. Микология и фитопатология. — 2003. — Т. 37. — С. 14—19. / *Garibova L.V., Antimonova L.A., Zav'yalova L.A., Krasnopol'skaya L.M. Rost i morfologicheskie priznaki mitseliya trutovika lakirovannogo Ganoderma lucidum v zavisimosti ot usloviy kul'tivirovaniya. Mikologiya i fitopatologiya* 2003; 37: 14—19. [in Russian]
 23. **Краснополяская Л.М., Антимонова А.В., Белицкий И.В. и др.** Лекарственный лекарственный базидиальный гриб *Ganoderma lucidum* (Curt.: F.r) P. Karst.: погруженное культивирования и противоопухолевые свойства. Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. М.: 2003. — С. 46—55. / *Krasnopol'skaya L.M., Avtimonova A.V., Belitskiy I.V. i dr. Lekarstvennyy lekarstvennyy bazidial'nyy grib Ganoderma lucidum (Curt.: F.r) P. Karst.: pogruzhennoe kul'tivirovaniya i protivopukholevye svoystva. Netraditsionnye prirodnye resursy, innovatsionnye tekhnologii i produkty. M.: 2003; 46—55. [in Russian]*
 24. **Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А. и др.** Влияние условий глубинного культивирования лекарственного гриба *G. lucidum* на образование полисахаридов. Биотехнология. — 2007. — № 6. — С. 34—41. / *Babitskaya V.G., Shcherba V.V., Puchkova T.A. i dr. Vliyanie usloviy glubinnogo kul'tivirovaniya lekarstvennogo griba G. lucidum na obrazovanie polisakharidov. Biotekhnologiya* 2007; 6: 34—41. [in Russian]
 25. **Сидоренко М.Л.** Оптимизация среды для глубинного культивирования мицелия *Fomitopsis officinalis*. Успехи медицинской микологии. — 2006. — Т. 7. — С. 304—306. / *Sidorenko M.L. Optimizatsiya sredy dlya glubinnogo kul'tivirovaniya mitseliya Fomitopsis officinalis. Uspekhi meditsinskoy mikologii* 2006; 7: S. 304—306. [in Russian]
 26. **Buchalo A., Mykchaylova O., Lomberg M., Wasser S.P., Buchalo A.** Microstructures of vegetative mycelium of macromycetes in pure cultures. Kiev: Alterpress, 2009; 224.
 27. **Ильин Д.Ю., Ильина Г.В.** Использование элемента селена при длительном хранении культур / Д.Ю. Ильин, Г.В. Ильина. Охрана растительного и животного мира Поволжья и сопредельных территорий. Пенза: 2003. — С. 114—115. / *Il'in D.YU., Il'ina G.V. Ispol'zovanie elementa selena pri dlitel'nom khraneni kul'tur / D.Yu. Il'in, G.V. Il'ina. Okhrana rastitel'nogo i zhivotnogo mira Povolzh'ya i sopredel'nykh territoriy. Penza: 2003; 114—115. [in Russian]*
 28. **Бухало А.С., Бабицкая В.Г., Биско Н.А. и др.** Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре. Сборник научных трудов в 2-х т. Киев: Альтпресс, 2011. — Т. 1. — 212 с. / *Bukhalo A.S., Babitskaya V.G., Bis'ko N.A. i dr. Biologicheskie svoystva lekarstvennykh makromitsetov v kul'ture. Sbornik nauchnykh trudov v 2-kh t. Kiev: Al'tpress, 2011; 1: 212. [in Russian]*
 29. **Бухало А.С.** Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. — 144 с. / *Bukhalo A.S. Vysshie s'edobnye bazidiomitsety v chistoy kul'ture. Kiev: Naukova dumka, 1988; 144. [in Russian]*
 30. **Шиврина А.Н., Низковская О.П., Фалина Н.Н. и др.** Биосинтетическая деятельность высших грибов Л. 1969. — 199 с. / *Shivrina A.N., Nizkovskaya O.P., Falina N.N. i dr. Biosinteticheskaya deyatel'nost' vysshikh gribov L. 1969; 199. [in Russian]*
 31. **Berry D.** The environmental control of the physiology of filamentous fungi / D.R. Berry // *Industrial Mycology* 1975; 1: 16—32.
 32. **Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Смирнова Д.А.** Факторы, влияющие на образование полисахарида *Ganoderma lucidum*. Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — № 2. — С. 194—199. / *Babitskaya V.G., Shcherba V.V., Puchkova T.A., Smirnova D.A. Faktory, vliyayushchie na obrazovanie polisakharida Ganoderma lucidum. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2005; 2: 194—199. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Громовых Татьяна Ильинична — д. б. н., профессор кафедры биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Гаврюшина Ирина Александровна — аспирант лаборатории химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Садыкова Вера Сергеевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Фельдман Наталия Борисовна — д. б. н., профессор кафедры биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Дмитренко Андрей Сергеевич — к. х. н., руководитель группы «международная аналитическая лаборатория», ФГБНУ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского, Москва

Айрапетова Асия Юрьевна — к. б. н., доцент кафедры биотехнологии, Пятигорский филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск

Луценко Сергей Викторович — д. б. н., профессор, заведующий кафедрой биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Углублённое исследование противогрибковой активности соединений ряда серебряных солей пиразол-3-карбоксамидов

*В. В. НОВИКОВА, В. Л. ГЕЙН

Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь

In-Depth Investigation of Antifungal Activity of Compounds of Series of Silver Salts of Pyrazol-3-Carboxamids

V. V. NOVIKOVA, V. L. GEIN

Изучали противогрибковую активность 4 новых перспективных соединений ряда пиразол-3-карбоксамидов, содержащих ион серебра, в отношении клинических изолятов *Candida* spp. микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой среде. Представлены результаты углублённого исследования данных соединений в отношении клинических штаммов *Candida albicans* — типичного патогена, вызывающего вульвовагинальный кандидоз, а также в отношении реже встречаемых не-*albicans* видов *Candida* spp., проявляющих резистентность к наиболее часто используемым антимикотикам. Выявлено соединение, проявляющее высокую противогрибковую активность (МПК₅₀ 0,15 мкг/мл, МПК₉₀ 6,25 мкг/мл), рекомендуемое для дальнейших доклинических исследований.

Ключевые слова: вульвовагинальный кандидоз, противогрибковая активность, *Candida* spp., серебряные соли пиразол-3-карбоксамидов.

The aim of the study was to investigate the antifungal activity of 4 new promising compounds of pyrazole-3-carboxamides containing silver ion in relation to clinical isolates of *Candida* spp. using the micromethod of two-fold serial dilution in liquid medium. The article presents the results of an in-depth study of these compounds with respect to the clinical strains of *Candida albicans*, a typical pathogen causing vulvovaginal candidiasis, as well as to less common non-*albicans* *Candida* spp. that are resistant to the most commonly used antimycotics. The compound showing high antifungal activity (MIC₅₀ 0.15 mcg/ml, MIC₉₀ 6.25 mcg/ml), which is recommended for further preclinical studies, has been identified.

Keywords: vulvovaginal candidiasis, antifungal activity, *Candida* spp., silver salts of pyrazole-3-carboxamides.

Вульвовагинальный кандидоз (ВБК) — одно из самых распространённых инфекционных заболеваний женщин репродуктивного возраста. Типичной чертой этой патологии является склонность к рецидивам: согласно [1] у 40—50% женщин возникают повторные эпизоды, у 5% развивается хронический рецидивирующий ВБК. Развитию данного заболевания способствует различная фоновая патология: иммуносупрессия различной этиологии, дисбиотическое состояние слизистых оболочек, в том числе обусловленное антибактериальной терапией, экзогенные вмешательства — частые спринцевания, незащищённые половые контакты и др.

Ведущим этиологическим фактором ВБК (76,1—86% случаев) неизменно остаётся *Candida albicans* [1—5]. Реже встречающиеся не-*albicans* виды *Candida* spp. — *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.tropi-*

calis, *C.parapsilosis* и др., вызывающие данную патологию в 10—15,1% случаев [1, 3—5], представляют большой интерес для исследования с целью поиска эффективных антифунгальных средств в связи с их высокой резистентностью ко многим используемым антимикотикам [2—6].

Терапия ВБК базируется на применении препаратов азолового ряда, зачастую препаратом выбора является флуконазол. В настоящее время можно говорить о формировании тенденции нарастания резистентности представителей *Candida* spp. к используемым антимикотикам, в том числе для местного применения. По данным изучения профиля антимикотикочувствительности дрожжеподобных грибов, выделенных из секрета влагалища [4], показатели чувствительности *C.albicans* к флуконазолу составили только 61%, все изученные штаммы не-*albicans* видов *Candida* были резистентны к флуконазолу. В работе [2] также подтверждено прогрессивное снижение чувствительности *C.albicans* к флуконазолу: количество чувствительных штаммов за семилетний период

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: 614107, Пермь, ул. Уральская 51А-45.

наблюдения уменьшилось со 100 до 70,4%. По данным некоторых зарубежных исследователей [7], только у 8 пациенток с ВВК из 25 (у 32%), включённых в исследование, выделены штаммы *C.albicans*, МПК флуконазола в отношении которых составила 2 мкг/мл, что в соответствии с критериями EUCAST свидетельствует о чувствительности штамма к этому препарату. В отношении остальных штаммов МПК флуконазола составила 4–128 мкг/мл. По результатам наших исследований [5], зафиксированы высокие показатели резистентности изолятов *Candida* spp., выделенных из отделяемого половых путей, к антимикотикам азолового ряда: 64,8% *C.albicans* были резистентны к клотримазолу, 88,9% — к кетоконазолу, 90,7% — к флуконазолу. Большинство (60–80%) изолятов *C.glabrata* проявили устойчивость к кетоконазолу и флуконазолу. Наиболее высокие показатели резистентности к флуконазолу и кетоконазолу выявлены у *C.krusei* — 100% изолятов.

Применение солей серебра в медицине для лечения патологических процессов в области кожных покровов и слизистых оболочек, вызываемых патогенной и условно-патогенной флорой, имеет длительную историю. Однако использование данных соединений с целью воздействия на возбудителей микозов практически не применяется. Наличие органической составляющей молекулы соединений, связанной с ионами серебра предположительно будет способствовать замедлению процесса высвобождения последних, тем самым оказывая более щадящее действие на кожу при поверхностных грибковых инфекциях.

Цель исследования — изучение чувствительности клинических изолятов *Candida* spp. к 4 перспективным соединениям (I–IV), ряда пиразол-3-карбоксамидов, содержащих ион серебра, проявивших высокую противогрибковую активность в отношении типовых штаммов.

Материал и методы

Исследованы 28 штаммов грибов рода *Candida*, выделенных от пациенток многопрофильных клиник (поликлиники и стационары) г. Перми (биосубстрат — отделяемое влагалища), устойчивых к флуконазолу: 22 штамма *C.albicans*, 4 штамма *C.krusei*, 1 штамм *C.glabrata*, 1 штамм *C.tropicalis*. Выбор данного антимикотика обусловлен его высокой востребованностью в клинической практике. Для оценки чувствительности выделенных штаммов грибов был использован диско-диффузионный метод — унифицированный, доступный и легко воспроизводимый метод. Посевы осуществляли на агар Сабуро. Использовали диски производства компании ЗАО «НИЦФ» ДИ-ПЛС-50-01, содержащие 40 мкг флуконазола. Инокулированные чашки с дисками инкубировали при температуре $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 40–48 ч. Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с инструкцией производителя.

Исследование противогрибковой активности соединений, проявивших высокую антимикотическую активность в отношении типовых штаммов *C.albicans* 883-658 и *C.albicans* 10231, проводили микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой среде (в 96-луночных планшетах), рекомен-

Таблица 1. Чувствительность клинических изолятов *Candida* spp. к изученным соединениям

МПК, мкг/мл	Количество изолятов <i>Candida</i> spp.				
	I	II	III	IV	флуконазол
0,06	10	5	6	13	1
0,125	2	0	0	0	0
0,25	2	1	0	2	1
0,5	0	0	1	0	6
1	0	2	0	3	2
2	1	1	2	3	3
4	0	3	2	1	5
8	8	6	6	4	6
16	4	2	1	2	2
32	1	8	3	0	2
≥32	0	0	4	0	0
Всего	28	28	28	28	28

дованным [8, 9], чувствительность каждого из штаммов определяли в двух повторностях. Концентрация микробных клеток в опыте составила $2-5 \times 10^4$ КОЕ/мл. В качестве положительного контроля использовали питательную среду без противогрибкового препарата с внесённой исследуемой культурой, качество среды контролировали, применяя референтные штаммы. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Планшеты инкубировали в термостате при температуре $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Оценку роста культур проводили визуально на 40–48 ч и 70–72 ч инкубирования, в соответствии с [9]. В качестве значения МПК принимали концентрацию препарата в последней прозрачной лунке серии разведения. Полученные первичные результаты обрабатывали с использованием стандартных статистических методов, усредняя результаты, полученные в двух повторностях. В качестве препарата сравнения использовали флуконазол.

Результаты исследования

В ходе настоящего исследования выявлено, что изученные соединения проявляют высокую противогрибковую активность в отношении представителей рода *Candida*. Полученные результаты представлены в табл. 1.

В соответствии с руководством EUCAST, для признания штамма *C.albicans* чувствительным к флуконазолу МПК этого препарата не должна превышать 2 мкг/мл, а в случае, если МПК флуконазола превышает 4 мкг/мл, штамм *C.albicans* считается резистентным. В соответствии с критериями CLSI, резистентными к флуконазолу явля-

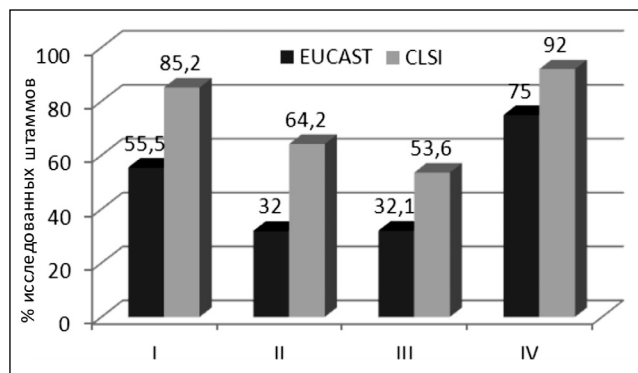


Рис. 1. Чувствительность штаммов *Candida* spp. к изучаемым соединениям (% исследованных штаммов).

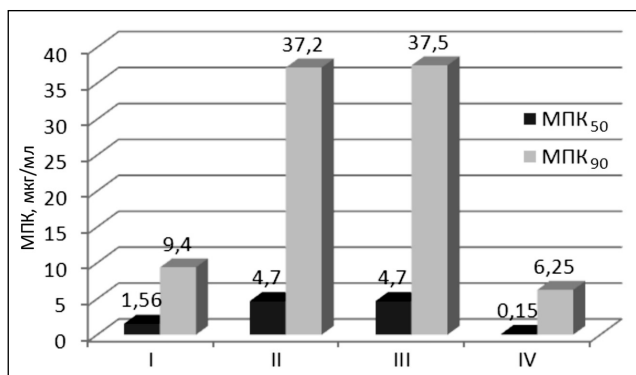


Рис. 2. МПК₅₀ и МПК₉₀ изученных соединений в отношении изученных штаммов *Candida* spp.

ются штаммы с МПК₅₀ ≥ 8 мкг/мл [10]. Данные по чувствительности штаммов *Candida* spp. к изучаемым соединениям представлены на рис. 1. Таким образом, наиболее перспективным соединением как по критериям EUCAST, так и CLSI является соединение IV (чувствительны 75 и 92% штаммов, соответственно).

Популяция чувствительных штаммов часто является разнородной. При этом важное значение

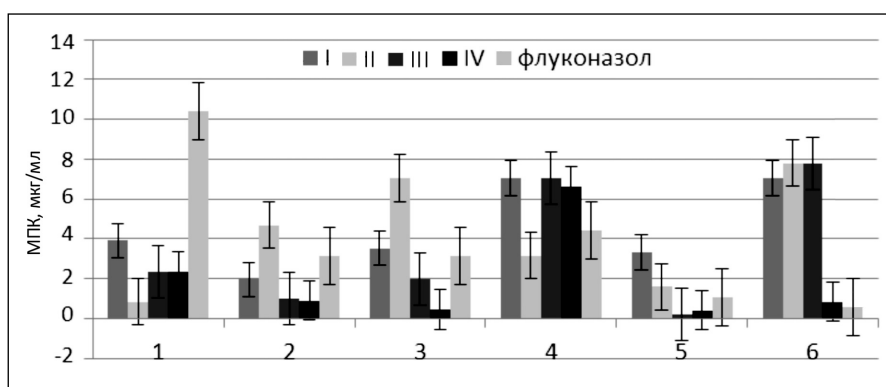


Рис. 3. Чувствительность штаммов *Candida non-albicans* к изучаемым соединениям

ЛИТЕРАТУРА

1. Савичева А.М., Мартикайнен З.М., Абашова Е.И. и др. Рецидивирующий урогенитальный кандидоз: лечение с использованием флуконазола. Журнал акушерства и женских болезней. — 2008. — Т. LVII. — № 1. — С. 41–46. / Savicheva A.M., Martikaynen Z.M., Abashova E.I. i dr. Retsidiviruyushchiy urogenital'nyy kandidoz: lechenie s ispol'zovaniem flyukonazola. Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney 2008; LVII: 1: 41–46. [in Russian]
2. Анкирская А.С., Муравьёва В.В., Фурсова С.А. и др. Мониторинг видового состава и чувствительности к антимикотикам дрожжеподобных грибов, выделенных из влагалища женщин репродуктивного возраста. Клин микробиол и мнтимикроб химиотер. — 2006. — Т. 8. — № 1. — С. 87–95. / Ankirskaya A.S., Murav'eva V.V., Fursova S.A. i dr. Monitoring vidovogo sostava i chuvstvitel'nosti k antimikotikam drozhzhopodobnykh gribov, vydelennykh iz vlagalishcha zhenshchin reproduktivnogo vozrasta. Klin mikrobiol i mntimikrob khimioter 2006; 8: 1: 87–95. [in Russian]
3. Долго-Сабурова Ю.В., Мирзабалаева А.К., Климо Н.Н. О проблеме резистентности возбудителей рецидивирующего вульвовагинального кандидоза. Гинекология. — 2014. — Т. 16. — № 1. — С. 3–6. / Dolgo-Saburova Yu.V., Mirzabalaeva A.K., Klimko N.N. O probleme rezistentnosti vozbuditeley retsidiviruyushchego vul'vovaginal'nogo kandidoza. Ginekologiya 2014; 16:1: 3–6. [in Russian]

Таблица 2. Чувствительность клинических изолятов *Candida non-albicans* к изученным соединениям

Изучаемый микроорганизм	МПК, мкг/мл				флуконазол
	I	II	III	IV	
<i>C.krusei</i> (1)	3,9	0,9	2,4	2,3	10,4
<i>C.krusei</i> (2)	1,9	4,7	1,0	0,9	3,2
<i>C.krusei</i> (3)	3,7	7,0	1,9	0,5	3,2
<i>C.krusei</i> (4)	7,0	3,2	7,0	6,6	4,4
<i>C.glabrata</i> (5)	3,3	1,6	0,2	0,4	1,0
<i>C.tropicalis</i> (6)	7,0	7,8	7,8	0,9	0,6

имеет распределение по показателям МПК₅₀ и МПК₉₀ (рис. 2). Установлено, что наиболее активным соединением в отношении исследованных штаммов *Candida* spp. оказалось соединение IV.

Ввиду типичной для не-*albicans* штаммов высокой резистентности к используемым антимикотическим препаратам была проанализирована противогрибковая активность в отношении данных изолятов. Полученные усреднённые данные представлены в табл. 2.

Установлено, что соединение IV также проявило наиболее высокую антимикотическую активность в отношении большинства изученных штаммов, в ряде случаев превышающую активность препарата сравнения (рис. 3).

Заключение

Выявлено соединение ряда серебряных солей пирразол-3-карбоксамидов, представляющее интерес для дальнейшего доклинического исследования: изучения механизма антифунгального действия, скорости формирования резистентности, изучения противогрибковой активности в экспериментах *in vivo*.

4. Малова И.О., Кузнецова Ю.А. Чувствительность к антимикотикам *Candida* spp., выделенных от пациенток с хроническим рецидивирующим кандидозом урогенитального тракта. Проблемы медицинской микологии. — 2013. — Т. 15. — № 2. — С. 103. / Malova I.O., Kuznetsova Yu.A. Chuvstvitel'nost' k antimikotikam *Candida* spp., vydelennykh ot patsientok s khronicheskim retsidiviruyushchim kandidozom urogenital'nogo trakta. Problemy meditsinskoy mikologii 2013; 15: 2: 103. [in Russian]
5. Новикова В.В., Езов С.Г., Селиванова А.И. Анализ видового состава и чувствительности клинических изолятов *Candida* spp. к современным антимикотикам. Медицинский альманах. — 2017. — № 2. — С. 138–141. / Novikova V.V., Ezov S.G., Selivanova A.I. Analiz vidovogo sostava i chuvstvitel'nosti klinicheskikh izolyatov *Candida* spp. k sovremennym antimikotikam. Meditsinskiy al'manakh 2017; 2: 138–141. [in Russian]
6. Mohanty S., Xess I., Hasan F., Kapil A., Mittal S., Tolosa J. Prevalence & susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis. Indian J Med Res 2007; 126: 9: 216–219.
7. Marchaim D., Lemanek L., Bheemreddy S., Sobel J. Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Vulvovaginitis. Obstetrics & Gynecology 2012; 120:6: 1407–1414.
8. Определение чувствительности к микроорганизмам к антибактериальным препаратам: методические указания. МУК 4.2.1890-04.

- Утв 04.03.2004. / *Opređenje chuvstvitel'nosti k mikroorganizmov k antibakterial'nyy preparatam: metodicheskie ukazaniya*. MUK 4.2.1890-04. Utv 04.03.2004. [in Russian]
9. *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. — 944 с. / *Mironov A.N.* *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya*. M.: Grif i K, 2012. 944 s. [in Russian]
 10. *Веселов А.В., Козлов Р.С.* Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов. *Клин микробиол и антимикроб химиотер.* — 2016. — Т. 18. — № 2. / *Veselov A.V., Kozlov R.S.* *Invazivnyy kandidoz: sovremennye aspekty epidemiologii, diagnostiki, terapii i profilaktiki u razlichnykh kategoriy patsientov*. *Klin mikrobiol i antimikrob khimioter* 2016; 18: 2. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Новикова Валентина Васильевна — к. фарм. н., доцент, заведующий кафедрой микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), Пермь

Гейн В.Л. — д. х. н., профессор, заведующий кафедрой общей и органической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), Пермь

Изучение активности противовирусных препаратов в отношении возбудителя лихорадки Зика в культуре клеток

С. Я. ЛОГИНОВА, В. Н. ЩУКИНА, Г. В. БОРИСЕВИЧ, И. В. СУРОВЯТКИНА, С. В. БОРИСЕВИЧ

48 Центральный НИИ Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

The Study of Antiviral Drugs' Activity Against The Causative Agent of Zika Fever in Cell Culture

S. YA. LOGINOVA, V. N. SHCHUKINA, G. V. BORISEVICH, I. V. SUROVYATKINA, S. V. BORISEVICH

48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiyev Posad

Вирус Зика (ZIKV) является представителем вирусов рода *Flavivirus*, семейства *Flaviviridae*, и относится к зоонозным арбовирусным инфекциям, переносимым комарами рода *Aedes*. В организме человека этот флавивирус вызывает заболевание, известное как лихорадка Зика, этиологически родственное жёлтой лихорадке, лихорадкам денге, Западного Нила и Чикунгунья. Специфического лечения лихорадки Зика нет, вакцина или же химиопрепараты на сегодняшний день также отсутствуют. Проведенный сравнительный анализ эффективности химиопрепаратов, индукторов интерферона и двух классов интерферона α -, β -, и γ - показал, что препараты интерферона эффективно подавляют репродукцию вируса Зика в культуре клеток Vero в широком диапазоне концентраций. Химиопрепараты Триазавирин®, Виразол®, Зовиракс®, Цитарабин® и Ингавирин® не влияли на репродукцию вируса Зика, штамм MR 766V, в культуре клеток Vero. В присутствии Виразола® и Рибавирина® в концентрации 100 мкг/мл статистически значимо снижался размер негативных колоний вируса Зика.

Ключевые слова: вирус Зика, Триазавирин®, Рибавирин®, Ингавирин®, Реаферон-ЕС®, Ребиф ($\beta 1a$)®, противовирусная эффективность, культура клеток.

Zika virus (ZIKV) is a representative of the viruses of the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*, it belongs to the zoonotic arbovirus infections transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*. In humans, this flavivirus causes a disease known as zika fever, etymologically related to yellow fever, dengue, West Nile and Chikungunya viruses. There is no specific treatment for zika fever, just as there is no vaccine or preventive measures available to date. A comparative analysis of the effectiveness of chemotherapy medications, interferon inducers and two classes of interferon α -, β -, and γ - showed that interferon drugs effectively inhibit the reproduction of Zika virus in Vero cell culture in a wide range of concentrations. Chemotherapy medications Triazavirin®, Virazole®, Zovirax®, Cytarabine®, and Ingavirin® did not affect the reproduction of Zika virus strain MR 766V in Vero cell culture. The size of negative Zika virus colonies was significantly reduced in the presence of Virazole® and Ribavirin® at a concentration of 100 μ g/ml.

Keywords: zika virus, Triazavirin®, Ribavirin®, Ingavirin®, Reaferon-EU®, Rebif ($\beta 1a$)®, antiviral efficacy, cell culture.

Введение

В связи со сложившейся неблагополучной эпидемической ситуацией в мире по лихорадке Зика, активно проводятся исследования по выявлению эффективных противовирусных средств в отношении его возбудителя [1–3].

Так, учитывая особенности репликативного цикла вируса Зика, особый интерес представляют гипополипидермический компонент nordihydroguaiaretic acid (NDGA) и его синтетический дериват — tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic (M4N) [3]. В культуре клеток Vero (CCL-81) препараты NDGA, M4N, Zileuton, Fatostatin, Resveratrol, и BFA в концентрациях 10–35 mM

при внесении в среду через 1 ч после инфицирования эффективно подавляют репродукцию вируса Зика [4–8] и могут рассматриваться как потенциальные лекарственные препараты против флавивирусных инфекций [9]. До настоящего времени в мире отсутствуют лицензированные препараты в отношении лихорадки Зика, поэтому актуальным являются исследования по поиску эффективных средств защиты от лихорадки Зика.

Цель работы — изучение *in vitro* эффективности некоторых химиопрепаратов, индукторов интерферона и рекомбинантных человеческих интерферонов.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус Зика, штамм MR 766, хранящийся в Специализированной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 141306, г. Сергиев Посад-6. ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ

Исследуемые препараты. Рибавирин® — препарат (1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) производства Dragon Hwa ChemPharm Co. Limited. Виразол® (Virazole ICN) — химиопрепарат производства ICN «Pharmaceuticals», США. Зовиракс® — химиопрепарат произведён компанией Вэлком Фаундейшен Лимитед, Великобритания. Цитарабин-ЛЭНС — препарат производства ООО «ЛЭНС-ФАРМ». Ингавирин® — противовирусный химиопрепарат ОАО Валента Фармацевтика, Россия. Триазавирин® — противовирусный препарат, производства «Медсинтез», Россия. Реаферон — ЕС® — человеческий рекомбинантный α -2b-интерферон производства ЗАО «Вектор-Медика», Россия. Rebif (β 1a) — человеческий рекомбинантный β -1a интерферон производства Seroipo, Италия. Роферон-А — человеческий рекомбинантный интерферон α -2a производства Ф. Хоффманн-Ля рош Лтд., Швейцария. Гаммаферон — генно-инженерный человеческий γ -интерферон производства НПО «Фермент» «Санитас». Ларифан — высокомолекулярный индуктор интерферона, дц РНК фага f_2 *E. coli*, производства Института микробиологии им. Кирхенштейна, Латвия. Ридостин® — высокомолекулярный индуктор интерферона, дц РНК дрожжей, производства ЗАО «Вектор-Медика», Россия.

Культура клеток. Использована постоянная культуры клеток почек африканской зелёной мартышки — Vero. В качестве ростовой среды и среды поддержания использовали полусинтетическую среду (ПС-4) на растворе Ирля, содержащую 7,5 и 2 % сыворотки крупного рогатого скота, соответственно.

Оценка биологических свойств вируса. Биологическую активность вируса Зика оценивали титрованием в культуре клеток Vero по формированию негативных колоний (lg БОЕ/мл).

Оценка противовирусной эффективности экспериментальных субстанций осуществлена в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России [10].

Основными критериями оценки эффективности препаратов *in vivo* являются подавление уровня накопления вируса (lg БОЕ/мл) и показатель коэффициента ингибирования репродукции вируса (Ки, процент).

Результаты и обсуждение

Проведённые исследования по оценке уровня накопления вируса Зика, штамм MR 766, при различной множественности заражения в культуре клеток Vero выявили, что возбудитель в широком диапазоне инфицирующих доз накапливается в высоких концентрациях. Оценку противовирусной эффективности лекарственных препаратов проводили в культуре клеток Vero при инфицирующей дозе 0,001 БОЕ на клетку.

Для изучения влияния препаратов на репродукцию вируса Зика, штамм MR 766, лекарственные препараты вносили в культуру клеток по следующим схемам: за 24 ч до инфицирования в среду поддержания и через 2 ч после инфицирования.

При изучении эффективности препаратов выявили, что Триазавирин®, Виразол® и Ингавирин® при применении как до, так и после инфицирования в высоких концентрациях практически не влияли на уровень накопления вируса в культуре клеток Vero C1008. При внесении препаратов до инфицирования клеток Виразол®, Триазавирин® и Ингавирин® в концентрации 100 мкг/мл подавляли репродукцию вируса на 31, 58 и 67%, соответственно. При внесении препаратов после инфицирования клеток Ингави-

рин® и Триазавирин® не влияли на репродукцию вируса. Виразол® в концентрациях 100 и 10 мкг/мл подавлял репродукцию вируса на 79 и 20%, соответственно.

Человеческие рекомбинантные интерфероны обоих подклассов (α и β) Rebif (β 1a)® и Реаферон-ЕС® (α 2) в концентрации 10^5 МЕ/мл полностью подавляют репродукцию вируса Зика в культуре клеток Vero как при внесении до, так и после инфицирования клеток.

Высокомолекулярные индукторы интерферона Ларифан® и Ридостин® выявили низкую противовирусную активность. В высоких концентрациях при внесении препаратов как до, так и после инфицирования выявлено незначительное подавление репродукции вируса ($p < 0,05$). Ларифан® и Ридостин® в концентрации 100 мкг/мл подавляли репродукцию вируса на 84 и 53%, соответственно, при внесении до инфицирования; на 78 и 51%, соответственно, при внесении после инфицирования.

Для изучения влияния препаратов на формирование негативных колоний вирусом Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero лекарственные препараты в различных концентрациях вносили в агаровое покрытие.

При множественности инфицирования клеток 30 БОЕ препарат Rebif (β 1a)® в концентрации 10^4 — 10^5 МЕ/мл при внесении в агаровое покрытие полностью подавлял формирование негативных колоний вирусом в культуре клеток Vero. В более низких концентрациях препарат не влиял на образование негативных колоний (табл. 1).

Препарат Реаферон-ЕС (α 2в)® полностью подавлял формирование негативных колоний вирусом Зика в концентрациях 1000—100000 МЕ/мл. Более низкие концентрации не влияли на формирование негативных колоний вирусом Зика в культуре клеток Vero.

Роферон-А (α 2a)® так же как Реаферон-ЕС (α 2в)® полностью подавлял формирование негативных колоний вирусом Зика в концентрациях 1000—100000 МЕ/мл, в более низких концентрациях не влиял на формирование негативных колоний.

Гаммаферон® полностью подавлял формирование негативных колоний вируса Зика в концентрации 100 000 МЕ/мл. В более низких концентрациях препарат значимой эффективности не выявил.

Все изученные препараты (Виразол®, Рибавирин®, Ингавирин®, Зовиракс®, Цитарабин®) при внесении их в агаровое покрытие эффективности не выявили.

Изучение S-признака вируса Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero в присутствии интерферона установили, что все препараты с высокой степенью достоверности снижают размер не-

Таблица 1. Изучение влияния интерферона на формирование негативных колоний вирусом Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero

Препарат	Концентрация препарата, МЕ/мл	Количество негативных колоний, $\bar{X} \pm \sigma_x$	Коэффициент ингибирования формирования бляшек, процент
Rebif ($\beta 1a$) [®]	10 ⁵	0±0	100
	10 ⁴	0±0	100
	10 ³	15±3	52
	10 ²	39±4	0
	10 ¹	34±2	0
	1	41±5	0
Реаферон-ЕС ($\alpha 2b$) [®]	10 ⁵	0±0	100
	10 ⁴	0±0	100
	10 ³	0±0	100
	10 ²	23±1	24
	10 ¹	30±6	1
	1	32±3	0
Роферон-А ($\alpha 2a$) [®]	10 ⁵	0±0	100
	10 ⁴	0±0	100
	10 ³	0±0	100
	10 ²	23±2	24
	10 ¹	31±4	0
	1	32±3	0
Гаммаферон [®]	10 ⁵	0±0	100
	10 ⁴	19±2	36
	10 ³	27±2	12
	10 ²	34±3	0
	10 ¹	27±3	12
Контроль без препарата	—	30±2	—

Таблица 2. Изучение влияния интерферона на S-признак вируса Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero

Препарат	Концентрация препарата, МЕ/мл	S-признак, мм, $\bar{X} \pm \sigma_x$	Снижение диаметра бляшек, Δ , мм, $X_{ср}$	Достоверность редукции бляшек, уровень значимости, %
Rebif ($\beta 1a$) [®]	10 ³	0,69±0,04	4,62	99,9
	10 ²	3,98±0,12	1,33	99,9
	10 ¹	5,23±0,19	0,07	<50
	1	4,95±0,18	0,36	80,0
Реаферон-ЕС [®] ($\alpha 2$)	10 ²	1,30±0,14	4,0	99,9
	10 ¹	3,31±0,15	2,0	99,9
	1	5,33±0,25	отс	<50
Роферон-А [®]	10 ²	1,52±0,12	3,78	99,9
	10 ¹	3,24±0,11	2,07	99,9
Гаммаферон [®]	10 ⁴	1,46±0,13	3,85	99,9
	10 ³	3,92±0,17	1,38	99,9
	10 ²	4,64±0,28	0,67	96,0
	10 ¹	5,01±0,23	0,29	75,0
Контроль без препарата	—	5,30±0,16	—	—

гативных колоний. Формирование точечных негативных колоний в присутствии интерферона, скорее всего, указывает на образование дефектных вирусных частиц (табл. 2).

Изучение S-признака вируса Зика, штамм MR 766, в присутствии химиопрепаратов выявило, что различие диаметра негативных колоний в контроле и опыте (Зовиракс[®], Ингавирин[®]) не были статистически значимыми. Рибавирин[®] и Виразол[®] в концентрации 100 мкг/мл при внесении их в агаровое покрытие достоверно снижали размер негативных колоний вируса Зика. В присутствии Цитарабина[®] негативные колонии, формируемые вирусом Зика, имели размытые края и увеличивались в диаметре (табл. 3).

В работе изучали противовирусную активность *in vitro* в отношении вируса Зика представителей трёх классов неспецифических медицинских

средств защиты: химиопрепараты, индукторы интерферона и рекомбинантные интерфероны.

Нуклеозидные аналоги представляют собой важный класс противовирусных агентов и в настоящее время широко используются в качестве терапии вирусных инфекций человека, включая СПИД и вирус гепатита В, цитомегаловирус и вирус простого герпеса [11]. Поскольку клетки человека не имеют РНК-зависимой РНК-полимеразы (RDRP), этот класс ферментов, по-видимому, один из самых перспективных мишеней для противовирусного действия в отношении флавивирусов, которые используют RDRP для репликации. Нуклеозидные аналоги могут ингибировать вирусные RDRP, подавляя, таким образом, вирусную репликацию. Эти агенты, как правило, являются безопасными и хорошо переносимыми, так как они нацелены на вирусную, а не клеточ-

Таблица 3. Изучение влияния препаратов на S-признак вируса Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	S-признак, мм, $\bar{X} \pm \delta_x$	Снижение диаметра бляшек, Δ , мм, X_{cp}	Достоверность редукции бляшек, уровень значимости, %
Виразол®	100	4,42±0,25	0,89	99,0
Рибавирин®	100	4,58±0,10	0,72	99,8
Ингавирин®	250	5,55±0,34	отс	<50
Зовиракс®	100	5,01±0,23	0,29	75,0
Цитарабин®	100	6,07±0,24	отс	98,0*
Контроль без препарата	—	5,30±0,16	—	—

Примечание. * — увеличение размера негативных колоний.

ную полимеразу и способны вызывать преждевременное прекращение синтеза вирусной нуклеиновой кислоты [11]. В отношении возбудителя лихорадки Зика оценена противовирусная активность ряда аналогов нуклеозидов [1]. Рибавирин и Фавипиравир уже одобрены для использования в качестве противовирусных препаратов для человека в отношении других вирусных инфекций (ЛЗН, денге, жёлтая лихорадка, КЭ, ЯЭ), но показали меньшую противовирусную эффективность *in vitro* в отношении вируса Зика [12]. Исследованные химиопрепараты (Рибавирин®, Зовиракс®, Цитарабин-ЛЭНС, Ингавирин®, Триазавирин®) при внесении в различных схемах не влияли на репродукцию вируса. При этом следует отметить, что лекарственные препараты Виразол® и Рибавирин® с высокой степенью достоверности (99,0 и 99,8%, соответственно) снижают размер негативных колоний.

Изучение эффективности рекомбинантного β (ИФ- β) и TNF- α в эпителиальных клетках A549 и клетках Vero показало, что при внесении до инфицирования препараты выявили высокую противовирусную активность. При внесении через 2 ч после инфицирования наблюдали более низкую эффективность по снижению репродукции вируса Зика [2]. Высокую противовирусную эффек-

тивность в отношении вируса Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero выявили рекомбинантные интерфероны двух классов: γ и α , β . Препараты в широком диапазоне концентраций эффективно подавляют репродукцию вируса, а в низких концентрациях вызывают редукцию негативных колоний. Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы. Оба ИИФ типа I и типа II продемонстрировали активность в отношении вируса Зика. Вероятно, ИФН γ , IFN- β и ИФН β можно оценивать в клинических условиях как средство профилактически, постконтактной профилактики и лечения от инфекции, вызванной вирусом Зика.

Резюмируя изложенное можно заключить, что видимое многообразие химиопрепаратов не отражает истинного диапазона их антивирусной активности.

Таким образом, из всех изученных лекарственных средств только рекомбинантные интерфероны выявили высокую противовирусную эффективность *in vitro* в отношении вируса Зика.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Mumtaz N., van Kampen J.J., Reusken C.B., Boucher C.A., Koopmans M.P. Zika Virus: Where Is the Treatment? Curr Treat Options Infect Dis 2016; 8: 208—211. doi: 10.1128/CMR.00072-15.
- Frumence E., Roche M., Krejbich-Trotot P. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- γ production and apoptosis induction. Virology 2016; 493: 217—226. doi: 10.1016/j.virol.2016.03.006.
- Shao W., Espenshade P.J. Expanding roles for SREBP in metabolism. Cell. Metab 2012; 16: 414—419. doi: 10.1016/j.cmet.2012.09.002.
- Soto-Acosta R., Bautista-Carbajal P., Syed G. H., Siddiqui A., Del Angel R. M. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits replication and viral morphogenesis of dengue virus. Antiviral Res. 2014; 109: 132—140. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.07.002.
- Syed G. H., Siddiqui A. Effects of hypolipidemic agent nordihydroguaiaretic acid on lipid droplets and hepatitis C virus. Hepatology. 2011; 54: 1936—1946. doi: 10.1002/hep.24619.
- Nour A. M., Li Y., Wolenski J., Modis Y. Viral membrane fusion and nucleocapsid delivery into the cytoplasm are distinct events in some flaviviruses. PLoS Pathog 2013; 9: e1003585. doi.org/10.1371/journal.ppat.1003585.
- Pollara J. J., Laster S. M., Petty I. T. Inhibition of poxvirus growth by Terameprocol, a methylated derivative of nordihydroguaiaretic acid. Antiviral Res 2010; 88: 287—295. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.09.017.
- Chen Q. Nordihydroguaiaretic acid analogues: their chemical synthesis and biological activities. Curr Top Med Chem 2009; 9: 1636—1659.
- Grossman S. A., Ye X., Peereboom D., Rosenfeld M. R., Mikkelsen T., Supko J. G., Desideri S. Phase I study of terameprocol in patients with recurrent high-grade glioma. Neuro Oncol 2012; 14: 511—517. doi: 10.1093/neuonc/nor230.
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2013; 942с. / Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. chast' 2. M.: Minzdrav R.F., 2005. [In Russian]
- Eyer L., Nencka J., Huvarová I., Palus M., Joao Alves M., Gould E.A., De Clercq E., Růžek D. Nucleoside Inhibitors of Zika Virus. J Infect Dis. 2016; Sep 1; 214 (5): 707—711. doi: 10.1093/infdis/jiw226. Epub 2016 May 27.
- Botting C., Kuhn R.J. Novel approaches to flavivirus drug discovery. Expert. Opin Drug Discov 2012; 7 (5): 417—428. doi: 10.1517/1760441.2012.673579. Epub 2012 Mar 22.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Логинова Светлана Яковлевна — д. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Шукина Вероника Николаевна — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Борисевич Галина Валентиновна — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Суровяткина Ирина Валерьевна — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, член-корр. РАН; начальник института, Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Рациональная этиотропная терапия инфекций верхних дыхательных путей. Проблемы резистентности внебольничных микроорганизмов

И. А. КАРПОВ, Н. В. СОЛОВЕЙ

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Rational Etiotropic Treatment of Upper Respiratory Tract Infections. Problems of Antibiotic Resistance of Community-Acquired Infections

I. A. KARPOV, N. V. SOLOVEY

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

В статье представлены современные данные по антибиотикорезистентности и этиологии острых инфекций верхних дыхательных путей (тонзиллофарингита, риносинусита, среднего отита), рассмотрены возможности клинической дифференциации между бактериальным и вирусным генезом данных заболеваний, приведены рекомендации по обследованию пациентов и выбору рациональной антимикробной терапии.

Ключевые слова: тонзиллофарингит, риносинусит, средний отит, амоксициллин, амоксициллин/клавуланат, макролиды, цефалоспорины.

The article presents current data on antibiotic resistance and etiology of acute upper respiratory tract infections (tonsillopharyngitis, rhinosinusitis, otitis media); it discusses the possibilities of clinical differentiation between the bacterial and viral etiology of these diseases, provides recommendations on diagnosis and antimicrobial therapy.

Keywords: tonsillopharyngitis, rhinosinusitis, otitis media, amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, macrolides, cephalosporins.

Острые респираторные заболевания являются одними из самых распространённых патологических состояний в амбулаторной клинической практике и чаще всего протекают в виде инфекций верхних дыхательных путей (ИВДП) вирусной этиологии [1, 2]. Несмотря на то что только ограниченная часть ИВДП вызвана бактериями, практически 72% таких пациентов назначается системная антибактериальная терапия, что составляет 41% от всех антибиотиков, используемых вне стационаров [3, 4]. Систематический обзор и метаанализ Кокрановской группы проанализировал 11 рандомизированных контролируемых исследований (РКИ) применения антибиотиков против плацебо и не показал их каких-либо значимых преимуществ при ИВДП, включая острый риносинусит длительностью до 10 дней [5]. Необоснованное использование антибактериальных лекарственных средств прямо ассоциировано с риском ряда нежелательных, иногда жизнеугрожающих, побочных эффектов — аллергичес-

ких реакций, *C.difficile*-ассоциированной инфекции, нефро- и гепатотоксичности, а также с растущей в популяции селекцией антибиотикорезистентных возбудителей [2, 6]. Особой проблемой для практикующего врача является вопрос дифференциации между бактериальной и вирусной этиологией поражений респираторного тракта.

В публикации рассмотрены современные данные об этиологии ключевых острых респираторных заболеваний, предложены подходы, позволяющие с высокой вероятностью предполагать их бактериальный генез, а также приведены рекомендации по выбору оптимальной этиотропной терапии.

Острый тонзиллофарингит. Острый тонзиллофарингит (ОТФ) — остро развивающееся воспаление лимфоидных образований глоточного кольца (чаще всего небных миндалин) и слизистой оболочки ротоглотки. Данное состояние чаще вызывается вирусами (прежде всего, аденовирусами, вирусом Эпштейна—Барр и цитомегаловирусом, реже коронавирусами, риновирусами, респираторно-синтициальным вирусом, вирусами гриппа и парагриппа и т. д.), составляющими от 70% у детей до 90% у взрослых в структуре всех возбудителей ОТФ [7]. Кроме того, выделяют и

© И. А. Карпов, Н. В. Соловей, 2018

Адрес для корреспонденции: 220116, Минск, пр. Дзержинского, 83. Белорусский ГМУ

неинфекционные причины ОТФ, в частности, аллергию, синдром постназального затекания, воздействие раздражающих факторов (например, при курении, длительном дыхании недостаточно увлажненным воздухом), гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь и т. д. [8].

ОТФ бактериальной этиологии может вызываться *S.pyogenes* (бета-гемолитическим стрептококком группы А, БГСА), составляя до 5—15% всех случаев данного заболевания у взрослых и до 20—30% у детей [9]. Пиогенный стрептококк наиболее часто встречается у детей в возрасте 5—15 лет (пик 7—8 лет), особенно зимой и ранней весной [10]. ОТФ, вызванный БГСА, может сопровождаться непосредственными гнойными осложнениями (перитонзиллярным абсцессом, регионарным абсцедирующим лимфаденитом, флегмоной клетчаточных пространств головы и шеи), а также поздними иммунокомплексными заболеваниями (прежде всего, острой ревматической лихорадкой и острым постстрептококковым гломерулонефритом). Однако в последние годы все больше исследований говорят о другом значимом возбудителе ОТФ, который чаще встречается в популяции подростков и взрослых — анаэробной грамотрицательной палочке *Fusobacterium necrophorum* [11—13]. В одном исследовании 312 студентов 15—30 лет с симптоматикой ОТФ ДНК *F.necrophorum* методом ПЦР смывов с поверхности миндалин детектировалась в 4 раза чаще, чем ДНК *S.pyogenes*, при этом *F.necrophorum* среди обследованных студентов с клиникой заболевания встречалась в 20,5% случаев по сравнению с 9,4% случаев в контрольной группе без каких-либо проявлений поражения ротоглотки [14]. В систематическом обзоре, объединившем результаты 6 исследований, также было продемонстрировано, что *F.necrophorum* значительно чаще выявляется у пациентов с клинической картиной ОТФ по сравнению с пациентами без соответствующей клинической симптоматики (21,2 против 7,6%, $p<0,001$), при этом возбудитель особенно часто отмечался в группе курящих молодых (15—25 лет) мужчин с выраженным экссудатом на поверхности миндалин [15]. Данный возбудитель может быть ассоциирован и с часто рецидивирующими тонзиллофарингитами [16], а также с болезнью Лемьера (инфекцией окологлоточных пространств с септическим тромбозом внутренней яремной вены, бактериемией и метастатическими осложнениями) [17].

Безусловно, пациенты, страдающие бактериальным ОТФ, чаще обращаются за медицинской помощью по сравнению с пациентами, имеющими лёгкие формы вирусного тонзиллофарингита, однако на начальных этапах заболевания клиническая симптоматика в двух вышеперечисленных группах может быть сходной. В большинстве слу-

Модифицированная шкала Центора (шкала МакАйзека)

Симптом	Оценка
Температура тела $>38^{\circ}\text{C}$	1 балл
Отёчность и гиперемия миндалин, налеты на задней стенке глотки и миндалинах	1 балл
Отсутствие катаральных явлений и кашля	1 балл
Переднейшейный и/или подчелюстной лимфаденит (увеличенные и болезненные л. у.)	1 балл
Возраст	
5—14 лет	1 балл
15—44 года	0 баллов
≥ 45 лет	-1 балл

Примечание. Вероятность наличия стрептококковой инфекции в зависимости от балла по шкале МакАйзека: 0 баллов — 2—3%; 1 балл — 4—6%; 2 балла — 10—12%; 3 балла — 27—28%; 4 балла — 38—63%.

чаев, если у пациента имеются также иные проявления, кроме проявлений тонзиллофарингита (экзантема или энантема, кашель, ринорея, конъюнктивит, осиплость голоса), высока вероятность вирусной этиологии процесса. Для ОТФ бактериального генеза характерно внезапное начало заболевания с высокой лихорадкой и выраженным интоксикационным синдромом, сильные боли в горле вплоть до невозможности приёма жидкости и пищи, гиперемия и отёк миндалин с наличием экссудата на их поверхности, увеличение и выраженная болезненность углоточных лимфатических узлов (л. у.) [8]. Кроме того, полезным в практике врача может быть использование модифицированной МакАйзеком варианта прогностической шкалы Центора, рекомендованной в том числе существующими практическими рекомендациями по лечению ОТФ [18—20] (таблица).

Пациенты, не имеющие критериев или имеющие 1 критерий по данной шкале, не нуждаются в дополнительном лабораторном обследовании и назначении антибиотиков, так как изначально вероятность наличия у них ОТФ бактериальной этиологии крайне низка. В случае, если пациент имеет 2—3 критерия и более по шкале МакАйзека, показано его дообследование на предмет наличия в ротоглотке *S.pyogenes* с помощью лабораторных тестов либо назначение системной антибактериальной терапии.

Лабораторное подтверждение стрептококковой этиологии ОТФ возможно с помощью бактериологического посева мазка с поверхности миндалин или иммунохроматографического экспресс-теста при одновременном наличии у пациента клинико-эпидемиологических признаков острого заболевания [21]. Бактериологический посев остаётся золотым стандартом диагностики ОТФ, вызванного БГСА, однако мало применим в клинической практике из-за времени получения результата, составляющего не менее 48 ч [22]. Для определения этиологии ОТФ также возмож-

но использование метода ПЦР, обладающего высокой чувствительностью и специфичностью для подтверждения бактериальной этиологии процесса и позволяющего обеспечить быстрое получение результата [23, 24]. Хотя данный метод в настоящее время является ключевым для диагностики фузобактериозной этиологии ОТФ, так как имеется ряд объективных трудностей выделения *F.necrophorum* методами классической бактериологии, он остаётся недоступным в рутинной клинической практике [25].

В настоящее время, БГСА по-прежнему сохраняет чувствительность ко всем ключевым антибиотикам, используемым в амбулаторной клинической практике, в том числе 100% чувствительность к пенициллинам и цефалоспорином [8]. Резистентность пиогенного стрептококка к макролидам является хорошо описанным фактом и может варьировать в зависимости от региона от 5 до 23% и более, что затрудняет прогноз для конкретной страны без проведения собственных эпидемиологических исследований [26, 27]. *F.necrophorum*, которая особенно часто может вызывать бактериальные тонзиллофарингиты в группе пациентов 13–40 лет (подростки, молодые взрослые), природно резистентна к макролидам и фторхинолонам, но чувствительна к полусинтетическим пенициллинам, цефалоспорином, метронидазолу и клиндамицину [25].

У пациентов, не имеющих факторов риска носительства на слизистых ротоглотки *S.aureus* и признаков хронического тонзиллофарингита, оптимально использование в качестве стартовой антимикробной терапии амоксициллина по 1000 мг каждые 12 ч перорально 10 дней. Регистрируемая иногда клиническая неэффективность полусинтетических пенициллинов и ранние рецидивы стрептококкового тонзиллофарингита после первоначального клинического улучшения могут быть обусловлены рядом факторов, среди которых превалирует низкая приверженность пациента десятидневным курсам антибактериальной терапии ОТФ (пропуск разовых доз, сокращение длительности лечения), разрушением амоксициллина микроорганизмами, обитающими в полости рта (например, *S.aureus*, который не является этиологическим агентом ОТФ, но продуцирует пенициллиназы, разрушающие пенициллины и не защищённые аминопенициллины), а также ошибочная диагностика ОТФ вместо обострения хронического тонзиллофарингита [28, 29]. При наличии у пациента в анамнезе факторов риска носительства *S.aureus* (любая антибактериальная терапия в анамнезе в предшествующие 3 мес., пребывание в закрытых организованных коллективах), а также при документированной клинической неэффективности незащищённых пенициллинов, рецидиве ОТФ после

первоначального клинического улучшения предпочтение отдаётся ингибитор-защищённым бета-лактамам (амоксициллин/клавуланат по 1000 мг перорально каждые 12 ч 10 дней) или пероральным цефалоспорином. Среди последних особенно выделяются цефалоспорины III поколения (цефиксим по 400 мг каждые 24 ч перорально), срок терапии которыми при ОТФ может сокращаться до 5 дней без потери клинической эффективности и способности эффективно эрадикаровать *S.pyogenes* со слизистых ротоглотки [30]. Метаанализ 5 рандомизированных клинических исследований, включавший 1030 взрослых пациентов, показал, что использование пятидневных курсов антибактериальной терапии ОТФ пероральными цефалоспорином не уступает десятидневным курсам терапии аналогичными средствами в отношении бактериологической эрадикации БГСА (ОР 1,96, 95% ДИ 0,96–2,22, $p=0,008$) [31]. Важно помнить, что комплаентность пациента назначенной терапии во многом определяется кратностью приёма антибиотика и общей длительностью терапии. Цефиксим, используемый для лечения острого тонзиллофарингита в дозе 400 мг один раз в сутки 5 дней, позволяет полностью реализовать вышеперечисленные условия и добиться оптимальной приверженности к лечению у пациентов с ОТФ.

Следует обратить внимание, что при назначении большинства антибактериальных лекарственных средств обязателен десятидневный курс антибактериальной терапии. Это позволяет добиться стойкой эрадикации патогенов со слизистых ротоглотки, предупредить их дальнейшее распространение в организованных коллективах, предотвратить развитие ранних гнойных и поздних иммуноопосредованных осложнений.

При наличии у пациентов с ОТФ указаний на аллергические реакции к бензилпенициллину либо другим бета-лактамам антибиотикам в анамнезе по типу гиперчувствительности немедленного типа (крапивница, бронхоспазм, отёк Квинке, анафилаксия) все бета-лактамы антибиотики (пенициллины, цефалоспорины и т.д.) противопоказаны. В этом случае предпочтение отдаётся альтернативным группам антибактериальных лекарственных средств: макролидам (джозамицину по 1000 мг каждые 12 ч перорально, кларитромицину, азитромицину) либо линкозамидам (клиндамицину). При наличии аллергической реакции по другому типу гиперчувствительности на пенициллины, возможно безопасно использовать цефалоспорины, при этом цефалоспорины III поколения (цефиксим) в наименьшей степени способны вызывать перекрестные аллергические реакции у данной группы пациентов.

Острый риносинусит (ОРС). ОРС — воспаление слизистой носовой полости и придаточных

пазух носа, длящееся не более 4 недель, — распространённое заболевание в амбулаторной практике. Клинические симптомы ОРС вне зависимости от его генеза включают затруднение носового дыхания, слизистое или слизисто-гнойное назальное отделяемое, лицевые боли, снижение обоняния и кашель (вследствие затекания экссудата в начальные отделы дыхательных путей).

Дифференциальный диагноз вирусной и бактериальной этиологии заболевания крайне важен. С одной стороны, около 98% случаев ОРС имеют вирусный генез, при этом в реальной практике имеет место избыточное назначение антибиотиков, которые не улучшают течение заболевания, но обуславливают развитие ряда перечисленных выше нежелательных эффектов [32]. С другой стороны, не назначение либо неправильный выбор антибиотиков при бактериальном генезе ОРС сопровождается риском серьёзных внутричерепных осложнений (риногенный бактериальный менингит, тромбоз венозных синусов, абсцесс мозга, флегмона орбиты, мастоидит и т. д.). Рядом клинических руководств и исследований предложены 4 критерия, при наличии хотя бы одного из которых вероятность ОРС бактериальной этиологии достаточно высока и требует назначения системной антибиотикотерапии:

1) сохранение симптомов риносинусита (даже если он протекает с маловыраженной клинической симптоматикой) более 10 дней;

2) острое начало с высокой лихорадки, выраженной интоксикации, сильных нарастающих по интенсивности лицевых болей, гнойного назального отделяемого уже в первые несколько дней заболевания;

3) «двойная болезнь»: повторное усиление клиники ОРС на фоне первоначально улучшающихся у пациента симптомов острого респираторного заболевания;

4) отрицательная клиническая динамика на фоне проводимой патогенетической и симптоматической терапии ОРС [32—34].

Репрезентативным материалом для микробиологического исследования при подозрении на острый бактериальный риносинусит (ОБРС) является исключительно только содержимое придаточных пазух носа, полученное при их пункции. Показания для выполнения данной процедуры: тяжёлое течение заболевания с выраженной интоксикацией; предполагаемое распространение инфекции с развитием вторичных осложнений; отсутствие эффекта от проводимой системной антибиотикотерапии более 48 ч; затяжное течение риносинусита, несмотря на антибактериальную терапию; ОБРС у пациентов с иммунодефицитными состояниями; предположительно нозокомиальный генез патологического процесса. В тоже время следует отметить, что большинство

пациентов с ОБРС отвечает на консервативную терапию современными пероральными антибиотиками без выполнения им пункции придаточных пазух носа.

До 90% всех случаев ОБРС вызывают три ведущих возбудителя: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis*, до 10% приходится на *S.pyogenes*, *S.aureus*, Enterobacteriaceae и анаэробные микроорганизмы [34, 35]. Согласно результатам исследований ПеГАС-III, резистентность пневмококка к пенициллинам в Российской Федерации составляет в среднем 11,2% (9,1% — штаммы с умеренной резистентностью к пенициллину); подавляющее большинство штаммов *S.pneumoniae* (до 99,6%) чувствительны к амоксициллину [36]. Частота выделения пневмококков, нечувствительных к макролидам, в России также до недавнего времени составляла около 10% [36]. В тоже время данные ПеГАС-IV демонстрируют сохраняющуюся высокую чувствительность *S.pneumoniae* к пенициллинам (практически на прежнем уровне) и быстрый рост резистентности пневмококка к макролидам (до 22,9—23,5%). Выделенные в исследовании ПеГАС-IV штаммы гемофильной палочки также характеризовались высоким уровнем чувствительности к амоксициллину (90,0%) и амоксициллину/клавуланату (99,1%); не обнаружено изолятов *H.influenzae*, резистентных к цефалоспорином III поколения, карбапенемам и респираторным фторхинолонам [37].

Таким образом, антибиотиком выбора для стартовой терапии ОБРС в нашем регионе является амоксициллин по 1000 мг каждые 12 ч, 7—10 дней. В случае наличия у пациента факторов риска инфицирования более резистентными возбудителями, в том числе продуцирующими бета-лактамазы (возраст до 2 лет или старше 65 лет, пребывание пациента до заболевания в организованных закрытых коллективах, предшествующие госпитализации или предшествующая антибактериальная терапия в ближайшие 1—3 мес., наличие тяжёлой сопутствующей патологии или иммуносупрессии, рецидивирующее течение ОБРС), а также при тяжёлом/прогрессирующем течении заболевания, несмотря на стартовую терапию амоксициллином рекомендуется назначение ингибиторо-защищённых полусинтетических пенициллинов (амоксициллин/клавуланат по 1000 мг каждые 12 ч) или пероральных цефалоспоринов III поколения (цефиксим по 400 мг каждые 24 ч) перорально в течение 7—10 дней. В случае аллергических реакций на бета-лактамы антибиотики возможно использование макролидов (джозамицина, азитромицина, кларитромицина).

В 2016 г. FDA (США) выпустило предупреждение о том, что неблагоприятные побочные явления, связанные с приёмом фторхинолонов (тендиниты, периферическая нейропатия, удли-

нение интервала QT и т. д.), в целом нивелируют их преимущества у пациентов с респираторными инфекциями, включая ОБРС, и неосложнёнными инфекциями мочевыводящих путей. Поэтому в настоящее время респираторные фторхинолоны (левофлоксацин, моксифлоксацин) рекомендованы для терапии ОБРС только в тех клинических ситуациях, когда не остаётся других терапевтических альтернатив.

Длительность антибактериальной терапии ОБРС у взрослых пациентов, согласно практическим рекомендациям, варьирует от 5–7 до 10 дней [34, 38]. Однако результаты метаанализа 10 РКИ, сравнивающего эффективность коротких (до 7 дней включительно) и длительных (9 дней и более) курсов одних и тех же антибиотиков, не показали статистически значимой разницы в клинической и микробиологической эффективности терапии ОБРС в сравниваемых группах, при этом 5-дневные курсы антибиотикотерапии были сопоставимы с 10-дневными и характеризовались меньшей частотой побочных эффектов [39].

Острый средний отит (ОСО). ОСО — воспаление (в большинстве случаев вызываемое бактериями) полости среднего уха — является проблемой, прежде всего, в педиатрической практике. Преимущественно болеют дети от 3 мес. до 3 лет, и, по разным оценкам, от 25% детей в возрасте до 10 лет до 90% детей в возрасте до 5 лет переносят хотя бы 1 эпизод ОСО [40, 41]. Несмотря на то, что риск осложнений ОСО в целом оценивается как низкий (<1%), потенциальные интракраниальные осложнения (мастоидит, отогенный гнойный менингит, абсцессы мозга, тромбозы венозных синусов) являются жизнеугрожающими и даже при относительно благоприятном исходе могут сопровождаться резидуальными неврологическими последствиями.

Клиническими проявлениями ОСО являются лихорадочно-интоксикационный синдром, оталгия, повышенная возбудимость ребёнка, часто с отказом от еды, беспричинным плачем (в грудном возрасте), оторея. Согласно рекомендациям Американской ассоциации педиатров, диагностика ОСО требует обязательной отоскопии, при которой подтверждающими диагноз критериями являются: 1) наличие экссудата в полости среднего уха, проявляющееся выпячиванием барабанной перепонки с или без её гиперемии, или 2) появление отореи, не связанной с наружным отитом [42]. Микробиологическое исследование при ОСО выполняется в случае наличия отделяемого из полости среднего уха при самопроизвольном повреждении барабанной перепонки, а также если у ребёнка имеются показания для выполнения мириготомии (тимпаноцентеза): тяжёлое течение ОСО с выраженной интоксикацией и болью; отсутствие эффекта от антибиотикотерапии в те-

чение первых 2 суток; развитие ОСО у пациента, уже получающего адекватную антибактериальную терапию; гнойные осложнения ОСО (мастоидит, менингит, другие внутричерепные осложнения); новорождённые и дети грудного возраста, пациенты любого возраста с ИДС; дети, имевшие в анамнезе госпитализации в предшествующие 3 мес.; для верификации наличия экссудата в барабанной полости и определения его характера; при необходимости введения препаратов в барабанную полость.

Согласно результатам систематического обзора 66 исследований, проведенных по всему миру за 1970–2014 гг., ключевыми возбудителями ОСО являются *S.pneumoniae* и *H.influenzae*, реже встречается *M.catarrhalis* [43]. Данный систематический обзор продемонстрировал доминирующую роль пневмококка при развитии первого эпизода ОСО у ребёнка, и преобладающее выделение гемофильной палочки у детей с рецидивирующим ОСО, хроническим экссудативным средним отитом, ОСО с неэффективностью стартовой этиотропной терапии.

Решение о целесообразности немедленного назначения антибиотиков при ОСО базируется на оценке риска внутричерепных осложнений. Так, если возраст ребёнка до 2 лет, либо ребёнок старше 2 лет, но заболевание изначально протекает с лихорадкой выше 38,0°C, выраженным болевым синдромом более суток, либо имеется двусторонний ОСО рекомендуется сразу назначить антибактериальное лекарственное средство. При отсутствии факторов риска ранних внутричерепных осложнений допустима выжидательная тактика в течение 24 ч с применением ототопических препаратов (анальгетиков, противовоспалительных) с тщательным наблюдением за состоянием ребёнка и инициацией антибиотикотерапии при клиническом ухудшении.

Учитывая приведённые выше данные о низкой резистентности пневмококка в регионе к полусинтетическим пенициллинам и пероральным цефалоспорином III поколения, при лёгком и среднетяжёлом течении ОСО, первом эпизоде заболевания и отсутствии указаний на системную антибактериальную терапию в предшествующий месяц антибиотиком выбора является амоксициллин или макролиды (джозамицин, кларитромицин, азитромицин), альтернативными средствами — амоксициллин/клавуланат, пероральные цефалоспорины II–III поколения (цефуроксим аксетил, цефиксим и т.д.). В случае изначально тяжёлого течения заболевания, наличия факторов риска антибиотикорезистентных микроорганизмов (антибактериальная терапия в предшествующий месяц, рецидив или обострение хронической формы инфекции), а также при неэффективности стартовой этиотропной терапии рекомендуется использовать амоксициллин/клавуланат или пе-

поральные цефалоспорины. Следует избегать применения макролидов в случае высокого риска гемофильной этиологии заболевания (рецидивирующий ОСО, неэффективность стартовой терапии амоксициллином). Исследования демонстрируют, что применение азитромицина и кларитромицина обеспечивало эрадикацию *H.influenzae* из полости среднего уха только в 15—29% случаев [44]. Опубликованный впоследствии метаанализ 10 РКИ, включивший 2766 детей в возрасте от 6 мес. до 15 лет с ОСО, также продемонстрировал большую частоту клинической неэффективности макролидов по сравнению с бета-лактамами [45].

Следует отметить, что чувствительность и резистентность наиболее актуальных внебольничных микроорганизмов в Республике Беларусь, в целом имеют те же тенденции, что и в соседних странах и регионах. Так, у штаммов пневмококков по-прежнему, сохраняется высокая чувствительность к β -лактамам антибиотикам — к пенициллину до 95%, амоксициллину, цефтриаксону (описан единственный резистентный штамм у пациента с гнойным менингитом). В то же время отмечается высокая резистентность *Streptococcus pneumoniae* к тетрациклинам и ко-тримоксазолу (30,8 и 38,5%, соответственно). Довольно быстро растёт резистентность к макролидным антибиотикам, что ограничивает их использование, как антибиотиков первой линии. Лечение макролидами, прежде всего, подлежат лица с непереносимостью β -лактамов антибиотиков, а также при лечении заболеваний, вызванных атипичной флорой. Исследования, проведённые на небольшой группе пациентов, выявили резистентность к макролидам до 30,8% у инвазивных штаммов, хотя в целом по Республике эти значения составляют 15—17%. Гемофильная инфекция характеризуется сохранением высокой чувствительности к амоксициллину (98,5%), цефотаксиму, левофлоксацину (99,7%). Значительный уровень резистентности *Haemophilus influenzae* к ко-тримоксазолу (22,2%) ограничивает рекомендации его использования, исключает его применение в качестве этиотропной терапии инфекций, вызванных данным возбудителем [46].

Учитывая возможное различие в подходах к антибактериальной терапии респираторных инфекций, вызванных *Haemophilus influenzae* или *Streptococcus pneumoniae*, важно отметить клинические особенности протекания заболеваний, вызванных данными возбудителями, с целью их дифференциальной диагностики. Респираторная инфекция, вызванная *Streptococcus pneumoniae*, чаще характеризуется яркой клинической картиной, быстрым прогрессированием симптомов заболевания, высокой температурой. Сданной инфекцией сложно справиться без антибактериальной терапии. В данном случае препаратом выбора будет

амоксициллин в стандартной или высокой дозировке, но не амоксициллин/клавуланат. Напротив, инфекции, вызванные *Haemophilus influenzae*, чаще характеризуются неяркой, стёртой клинической картиной, слабой выраженностью симптомов, субфебрильной или даже нормальной температурой. Такая инфекция склонна к самоизлечению. Препаратами выбора в этом случае будут пероральные цефалоспорины III поколения (цефиксим) или амоксициллин/клавуланат.

В заключение, следует отметить, что в настоящее время в клинической практике широко используются антибиотики в лекарственной форме таблетки диспергируемые. Данная лекарственная форма позволяет, в частности, обеспечить максимальное всасывание амоксициллина в «абсорбционном окне», находящемся в проксимальном отделе тонкого кишечника, и таким образом улучшить эффективность и переносимость принимаемой терапии за счёт более высокой биодоступности препарата и уменьшения остаточных концентраций антибиотика в кишечнике. Диспергируемые таблетки также отличаются от традиционных лекарственных форм более высокой биодоступностью клавулановой кислоты. Это выгодно отличает данную группу лекарственных средств в отношении проблемы развития диареи на фоне приёма амоксициллина/клавуланата, что связано с усилением перистальтики, присущей клавулановой кислоте. Кроме того, диспергируемые таблетки, легко растворимые в небольшом объеме жидкости, удобны для приема в разных возрастных группах, испытывающих проблемы с глотанием обычных таблетированных лекарственных средств (дети с раннего возраста и пожилые пациенты).

Таким образом, для рационального использования антибиотиков в лечении инфекций верхних дыхательных путей следует представлять соотношение между бактериальными и вирусными возбудителями в зависимости от локализации процесса, спектр этиологически значимых агентов, возможности клинической и лабораторно-инструментальной диагностики, что в совокупности позволит решить вопрос о необходимости инициации и выборе оптимального антибиотика. На сегодняшний день имеется широкий выбор антибактериальных лекарственных средств, которые могут использоваться для успешной терапии острого тонзиллофарингита, острого риносинусита, острого среднего отита бактериальной этиологии, обладают высокой биодоступностью, не уступая по эффективности инъекционным антибиотикам, и выпускаются в удобных для пациента лекарственных формах, в том числе в лекарственной форме диспергируемых таблеток.

Примечание. Статья опубликована при поддержке компании Астеллас.

ЛИТЕРАТУРА

- Hong C.-Y. et al. Acute respiratory symptoms in adults in general practice. *Family Practice* 2004; 21: 3: 317–323.
- Teng C.L. Antibiotic prescribing for upper respiratory tract infections in the Asia-Pacific region: A brief review. *Malaysian Family Physician: The Official Journal of the Academy of Family Physicians of Malaysia* 2014; 9: 2: 18–25.
- Cantrell R., Young A.F., Martin B.C. Antibiotic prescribing in ambulatory care settings for adults with colds, upper respiratory tract infections, and bronchitis. *Clinical Therapeutics* 2002; 24: 1: 170–182.
- Shapiro D.J. et al. Antibiotic prescribing for adults in ambulatory care in the USA 2007–09. *Antimicrob Chemother* 2014; 69: 1: 234–240.
- Kenealy T., Arroll B. Antibiotics for the common cold and acute purulent rhinitis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013; 6: CD000247.
- Coenen S. et al. Appropriate international measures for outpatient antibiotic prescribing and consumption: recommendations from a national data comparison of different measures. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 2: 529–534.
- Zoorob R. et al. Antibiotic use in acute upper respiratory tract infections. // *American Family Physician* 2012; 86: 9: 817–822.
- Kocielek L.K., Shulman S.T. In the clinic. Pharyngitis. *Ann Intern Med* 2012; 157: 5: ITC3-1-ITC3-16.
- Ebell M.H. et al. The rational clinical examination. Does this patient have strep throat? *JAMA* 2000; 284: 22: 2912–2918.
- Shulman S.T. et al. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 10: E86-102.
- Amess J.A. et al. A six-month audit of the isolation of *Fusobacterium necrophorum* from patients with sore throat in a district general hospital. *Brit J Biomed Science* 2007; 64: 2–63–65.
- Jensen A., Hagelskjaer Kristensen L., Prag J. Detection of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* in tonsillitis in young adults by real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 7: 695–701.
- Hedin K. et al. The aetiology of pharyngotonsillitis in adolescents and adults — *Fusobacterium necrophorum* is commonly found. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: 3: 263: 1–7.
- Centor R.M. et al. The clinical presentation of *Fusobacterium*-positive and streptococcal-positive pharyngitis in a university health clinic: a cross-sectional study. *Ann Intern Med* 2015; 162: 4: 241–247.
- Klug T.E. et al. A systematic review of *Fusobacterium necrophorum*-positive acute tonsillitis: prevalence, methods of detection, patient characteristics, and the usefulness of the Centor score. *Eur J Clinical Microbiol Infect Dis* 2016; 35: 12: 1903–1912.
- Björk H. et al. Tonsillar colonisation of *Fusobacterium necrophorum* in patients subjected to tonsillectomy. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 264.
- Riordan T. Human infection with *Fusobacterium necrophorum* (*Necrobacillosis*), with a focus on Lemierre's syndrome. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 4: 622–659.
- Centor R.M. et al. The diagnosis of strep throat in adults in the emergency room. *Medical Decision Making: An Intern J Soc Med Dec Making* 1981; 1: 3: 239–246.
- McIsaac W.J. et al. Empirical validation of guidelines for the management of pharyngitis in children and adults. *JAMA* 2004; 291: 13: 1587–1595.
- ESCMID Sore Throat Guideline Group et al. Guideline for the management of acute sore throat. *ESCMID Sore Throat Guideline Group et al. Clin Microbiol Infect* 2012; 18 Suppl 1: 1–28.
- Fine A.M., Nizet V., Mandl K.D. Improved diagnostic accuracy of group A streptococcal pharyngitis with use of real-time biosurveillance. *Ann Intern Med* 2011; 155: 6: 345–352.
- Snow V. et al. Principles of appropriate antibiotic use for acute pharyngitis in adults. *Ann Intern Med* 2001; 134: 6: 506–508.
- Kolukirik M. et al. Development of a fast and low-cost qPCR assay for diagnosis of acute gas pharyngitis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016; 15: 1: 46.
- Pritt B.S. et al. Point-Counterpoint: A Nucleic Acid Amplification Test for *Streptococcus pyogenes* Should Replace Antigen Detection and Culture for Detection of Bacterial Pharyngitis. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 10: 2413–2419.
- Holm K. et al. The role of *Fusobacterium necrophorum* in pharyngotonsillitis — A review / K. Holm et al. *Anaerobe* 2016; 42: 89–97.
- Tanz R.R. et al. Community-based surveillance in the united states of macrolide-resistant pediatric pharyngeal group A streptococci during 3 respiratory disease seasons. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 12: 1794–1801.
- Syrogianopoulos G.A. et al. Seven-year surveillance of emm types of pediatric Group A streptococcal pharyngitis isolates in Western Greece. *PloS One* 2013; 8: 8: E71558.
- Pichichero M.E. et al. Penicillin failure in streptococcal tonsillopharyngitis: causes and remedies. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 9: 917–923.
- Pichichero M.E., Casey J.R. Systematic review of factors contributing to penicillin treatment failure in *Streptococcus pyogenes* pharyngitis. *Otolaryngology. Head and Neck Surgery* 2007; 137: 6: 851–857.
- Adam D., Hostalek U., Tröster K. 5-day cefixime therapy for bacterial pharyngitis and/or tonsillitis: comparison with 10-day penicillin V therapy. *Cefixime Study Group. Infection* 1995; 23: Suppl 2: S83-86.
- Pichichero M.E., Casey J.R. Bacterial eradication rates with shortened courses of 2nd- and 3rd-generation cephalosporins versus 10 days of penicillin for treatment of group A streptococcal tonsillopharyngitis in adults. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 2: 127–130.
- Fokkens W.J. et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2012; 50: 1: 1–12.
- Gonzales R. et al. Principles of appropriate antibiotic use for treatment of nonspecific upper respiratory tract infections in adults: background. *Ann Intern Med* 2001; 134: 6: 490–494.
- Chow A.W. et al. IDSA clinical practice guideline for acute bacterial rhinosinusitis in children and adults. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 8: E72-e112.
- Стречунский Л.С., Тарасов А.А., Крюков А.И. и др. Возбудители острого бактериального риносинусита. Результаты многоцентрового микробиологического исследования СССР. *Клин микробиол антимикроб химиотер.* — 2005. — №4. — С. 337–349. / Strachunskiy L.S., Tarasov A.A., Kryukov A.I. i dr. Vozbuditeli ostrogo bakterial'nogo rinosinusa. Rezultaty mnogotsentrovogo mikrobiologicheskogo issledovaniya SSSR. *Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2005; 4: 337–349. [in Russian]
- Козлов Р. С. Пневмококки: уроки прошлого — взгляд в будущее. Смоленск: МАКМАХ, 2010. — 128 с. / Kozlov R. S. Pnevmonokki: uroki proshlogo — vzglyad v budushchee. Smolensk: MAKMAKH, 2010; 128. [in Russian]
- Kozlov R. et al. ECCMID 2016, Amsterdam, 9–12 April, Abstract #4319.
- Kaplan A. Canadian guidelines for acute bacterial rhinosinusitis: clinical summary. *Canad Family Physic Med De Famille Canadien* 2014; 60: 3: 227–234.
- Falagas M.E. et al. Effectiveness and safety of short vs. long duration of antibiotic therapy for acute bacterial sinusitis: a meta-analysis of randomized trials. *Brit J Clin Pharmacol* 2009; 67: 2: 161–171.
- Atkinson H., Wallis S., Coatesworth A.P. Acute otitis media. *Postgrad Med* 2015; 127: 4: 386–90.
- Dickson G. Acute otitis media. *Primary Care* 2014; 41: 1: 11–18.
- Lieberthal A.S. et al. The diagnosis and management of acute otitis media. *Pediatrics* 2013; 131: 3: E964–999.
- Ngo C.C. et al. Predominant Bacteria Detected from the Middle Ear Fluid of Children Experiencing Otitis Media: A Systematic Review. *PloS One* 2016; 11: 3: E0150949.
- Dagan R. et al. Evidence to support the rationale that bacterial eradication in respiratory tract infection is an important aim of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 2: 129–140.
- Courter J.D. et al. Increased clinical failures when treating acute otitis media with macrolides: a meta-analysis. *Ann Pharmacother* 2010; 44: 3: 471–478.
- Муравьев А.А., Чагарян А.Н., Братусь Е.В., Перцева Т.А., Карпов И.А., Качанко Е.Ф. Серологическая характеристика и чувствительность к антибиотикам серотипов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в различных регионах Беларуси и Украины, выделенных у детей до 5 лет и пациентов старше 65 лет. *Клин микробиол антимикроб химиотер.* — 2013. — Т. 15. — № 2. — С. 147–158. / Murav'ev A.A., CHagaryan A.N., Bratus' E.V., Pertseva T.A., Karpov I.A., Kachanko E.F. Serologicheskaya kharakteristika i chuvstvitel'nost' k antibiotikam serotipov *Streptococcus pneumoniae*, tsirkuliruyushchikh v razlichnykh regionakh Belarusi i Ukrainy, vydelennykh u detey do 5 let i patsientov starshe 65 let. *Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2013; 15: 2: 147–158. [in Russian]
- Качанко Е.Ф. Внебольничная пневмония: современные подходы к диагностике и антибактериальной терапии. *Клин инфектол паразитол.* — 2018. — № 1. — С. 126–139. / Kachanko E.F. Vnebol'nichnaya pnevmoniya: sovremennye podkhody k diagnostike i antibakterial'noy terapii. *Klin infektol parazitolog* 2018; 1: 126–139. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Карпов Игорь Александрович — д. м. н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней БГМУ, Минск, Республика Беларусь

Соловей Никита Владимирович — к. м. н., доцент, доцент кафедры инфекционных болезней БГМУ, Минск, Республика Беларусь

Иммуномодулирующая терапия сопровождения при лечении больных запущенным туберкулёзом

В. М. КОЛОМИЕЦ¹, Н. В. РУБЛЕВА¹, А. Л. КОВАЛЕНКО², *Е. В. ТАЛИКОВА³

¹ Курский государственный медицинский университет МЗ РФ, Курск

² Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

³ Санкт-Петербургский Медико-социальный институт, Санкт-Петербург

Accompanying Immunomodulatory Therapy in Treatment of Patients with Neglected Tuberculosis

V. M. KOLOMIETS¹, N. V. RUBLEVA¹, A. L. KOVALENKO², *E. V. TALIKOVA³

¹ Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk

² Institute of Toxicology of the Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg

³ Saint-Petersburg Medico-Social Institute, Department of Morphology, Pathology and Forensic Medicine, St. Petersburg

Цель исследования — изучение эффективности включения в комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий больных с фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких препарата циклоферон. В связи с этим проведён анализ терапии 158 больных с фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких. Больные были разделены на 2 группы: основную (54 пациента), получившие кроме этиотропной терапии, комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий, включающий препарат циклоферон, назначенный по модифицированной методике в дозе 0,25 г × 2 раза в неделю до окончания интенсивной фазы основного лечения. Группу сравнения составили 104 пациента, которые получили этиотропную терапию и комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий: витаминно-, физиотерапия и психологическая поддержка. Эффективность этиотропной терапии оценивали после интенсивной фазы основного курса лечения длительностью не более 3 месяцев, а при лекарственноустойчивых формах и наличии отягощающих факторов — в течение 5 месяцев. Выявлено, что эффективность лечения у больных фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких определяется не только характером течения, длительностью основного курса лечения, наличием лекарственной устойчивости возбудителя к противотуберкулёзным препаратам, но и целым рядом факторов, комплексно влияющих на приверженность пациентов лечению. Так, неблагоприятные исходы лечения этой формы заболевания наблюдаются у пациентов с хроническим течением заболевания ($F_6=0,89$), обусловленным полирезистентным к противотуберкулёзным препаратам возбудителем ($F_8=0,65$), а также среди лиц, освобождённых из мест лишения свободы ($F_2=0,34$). Однако при этом даже кратковременное использование сопроводительной терапии циклофероном позволяет повысить эффективность лечения, улучшить течение процесса, включая прекращение выделения микобактерий у 94,1% больных при наличии у них сопутствующих заболеваний. Не исключено, что описанный эффект применения циклоферона в качестве терапии сопровождения обусловлен не только прямым его воздействием на иммунодефицит больного, но и опосредованно — влиянием на повышение приверженности лечению за счёт прекращения нарушений режима лечения и других, чисто психологических факторов, требующих дальнейшего изучения.

Ключевые слова: фиброзно-кавернозный туберкулёз, приверженность лечению, комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий, этиотропная терапия, циклоферон.

The aim of this research was to study the effectiveness of cycloferon inclusion in the complex of treatment and rehabilitation measures for patients with fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis. In this regard, an analysis of 158 patients with fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis was performed. The patients were divided into 2 groups: the main group (54 patients), in addition to etiotropic therapy, received a complex of therapeutic and rehabilitation measures, including preparation of cycloferon administered according to a modified procedure at a dose of 0.25 g 2 times per week until the end of the intensive phase of the main treatment. The comparison group consisted of 104 patients who received etiotropic therapy and a complex of therapeutic and rehabilitation measures: vitamin therapy, physiotherapy, and psychological support. The effectiveness of etiotropic therapy was evaluated after the end of the intensive phase of the main course of treatment which lasted no more than 3 months, and 5 months in the presence of drug-resistant forms and other aggravating factors. It was revealed that the effectiveness of treatment in patients with fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis is determined not only by the etiology of the disease course, the duration of the main course of treatment, and the presence of a pathogen resistant to anti-tuberculosis drugs, but also by a number of factors that influence patient adherence to treatment in a complex way. Unfavorable outcomes of treatment of this form of the disease were observed in patients with chronic course of the disease ($F_6=0.89$), caused by a multidrug-resistant agent ($F_8=0.65$), and among those released from prison ($F_2=0.34$). However, even short-term use of accompanying therapy with cycloferon allows increasing the effectiveness of treatment, improving the

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции:
E-mail: e.talikova@mail.ru

course of the process, including stopping the release of mycobacteria in 94.1% of patients with concomitant diseases. It is possible that the described effect of cycloferon as an accompanying therapy is based not only on its direct effect on patient's immunodeficiency, but also its indirect effect on the increase in adherence to treatment due to cessation of violations of the treatment regimen and other purely psychological factors that require further study.

Keywords: *fibrous-cavernous tuberculosis, adherence to treatment, complex of treatment and rehabilitation measures, etiotropic therapy, cycloferon*

Введение

Эпидемическая ситуация по туберкулёзу в России ещё далека от прогнозируемой и даже при достижении её стабилизации необходима интенсификация лечения, как основного противоэпидемического мероприятия [1–4]. Эффективность стандартизированной этиотропной терапии в течение последних лет, несмотря на внедрение новых режимов и препаратов, повышается крайне медленно. Между тем именно интенсификация лечения позволит снизить экономическое бремя туберкулёза. Однако лишь к концу выполнения Федеральной целевой программы МЗ РФ закрытие полостей распада на фоне применения стандартных режимов химиотерапии составляло среди впервые выявленных больных не более чем 61,5% (в 2005 г. — в 37,2%) [2, 5]. Особую тревогу вызывает снижение эффективности лечения запущенных форм заболевания, обусловленных возбудителем с множественной или широкой устойчивостью к этиотропным препаратам, являющимися основным источником инфекции [6]. Использование препаратов третьей группы (3 ряда) при лечении этих форм туберкулёза, таких как линезолид, амоксициллин + клавулановая кислота, имипенем + циластатин, меропенем и др. в связи с значительной токсичностью вызывает у пациентов негативную реакцию на проводимую терапию. Для предупреждения или ликвидации негативных реакций на препараты этиотропной терапии требуется проведение терапии сопровождения, позволяющей провести полный курс лечения [7, 8].

Цель исследования — изучение эффективности включения в комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий больных с фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких препарата циклоферон.

Материал и методы

Под наблюдение находились 158 больных с фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких (ФКТЛ). У всех пациентов были проведены стандартные общеклинические, лабораторные и исследования лучевыми методами, включая компьютерную томографию. При проведении этиотропной терапии использованы стандартные режимы, ориентированные на рекомендации ВОЗ (программа DOTS и DOTS+) и в соответствии с Приказом МЗ РФ [7].

Для определения факторов, влияющих на эффективность этиотропной и терапии сопровождения в условиях стационара, методом рандомизации сформированы и наблюдались следующие группы больных запущенными формами, преимущественно ФКТЛ.

Первая группа: 54 пациента с ФКТЛ, получавшие, кроме этиотропной терапии, комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий, включающий препарат циклоферон (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», г. Санкт-Петербург) назначенный по модифицированной методике в дозе 0,25 г × 2 раза в неделю до окончания ИФ ОКЛ [9], разрешённый в России к использованию при лечении туберкулёза с 2006 года и ранее при апробации показавший свою эффективность [10, 11]. В настоящем исследовании исходили из того, что, используя препарат на этапе интенсивной фазы основного курса лечения в стационарных условиях путём повышения уровня цитокинов Th1-ответа и снижения уровня цитокинов Th2-ответа возможно ожидать ускоренную ликвидацию клинических симптомов заболевания, снижения массивности или прекращения бактериовыделения, положительную динамику экссудативных проявлений, инволюцию очагово-инфильтративных проявлений и закрытие полостей распада [11, 12].

Вторая группа: 104 пациента с ФКТЛ, которые получали этиотропную терапию и комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий: витаминно-, физиотерапия и психологическая поддержка.

При поступлении в стационар все пациенты были обследованы в соответствии с общепринятыми стандартами: физикальное обследование, клинический и биохимический анализы крови, исследование мокроты методом бактериоскопии (в том числе люминесцентной) и посева на твёрдые питательные среды, результаты туберкулиновых проб. Инструментальное обследование выполнялось с использованием методов традиционной рентгеномографии, КТ и УЗИ. Кроме того, анализировались анамнез болезни и жизни, социально-экономические условия и жалобы для определения качества жизни больного. Диагноз сопутствующих заболеваний верифицировали с привлечением «узких» специалистов и назначением соответствующей терапии выявленных заболеваний. Достоверность информации подтверждалась документальными данными — истории болезни, амбулаторные карты, рентгенархив. Все пациенты повторно были обследованы к моменту завершения интенсивной фазы основного курса лечения (ИФ ОКЛ).

Для оценки эффективности использовали следующие критерии:

- исчезновение или значительное уменьшение симптомов интоксикации, проявлений грудного синдрома, нормализация показателей периферической крови (по данным клинического исследования крови);
- динамика морфологических изменений, по данным лучевых (R-рентгенологических) методов исследования: уменьшение количества очагов, участков инфильтративных изменений, размеров деструктивных изменений (полостей), рубцевание полостей;
- прекращение бактериовыделения, по данным микроскопии мокроты или посева, на 2, 3 и 5 месяцы интенсивной фазы основного курса лечения.

В целях определения уровня приверженности лечению больных использовали авторские методики и анонимное анкетирование [13]. Больному предлагалась специальная анкета, составленная таким образом, чтобы выявить не только объективные факторы, мешающие лечению (побочное действие лекарств, отсутствие контакта с медперсоналом), но и дать оценку таких субъективных факторов, как стресс, фрустрация, стиг-

Динамика приверженности лечению у больных в зависимости от схемы терапии сопровождения (в стенах)

Группы	Динамика приверженности лечения при ИФ ОКЛ			
	до начала	через 3 мес. от начала курса	после окончания	p
Основная (циклоферон) (n=54)	4,6	5,2	6,0	>0,05
Сравнения (n=104)	4,8	3,1	3,2	>0,05
p (1—2)	>0,05	<0,05	<0,05	

матизация, пристрастие к алкоголю и др. Язык предложенной анкеты доступен и свободен, количество вопросов ограничено, респондент не решает при анкетировании сложных задач.

Эффективность этиотропной терапии оценивали после интенсивной фазы основного курса лечения (ИФ ОКЛ) длительностью не более 3 месяцев, а при лекарственноустойчивых формах и наличии отягчающих факторов — в течение 5 месяцев.

Статистическая обработка материалов исследования проводилась с вычислением степени достоверности различий между математическими ожиданиями в сравниваемых группах, использовали современные программные комплексы Microsoft Windows-XP, стандартные пакеты статистических программ MS Excel, SPSS (версия 13.0), Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.).

Результаты и обсуждение

Большинство больных ФКТЛ были в возрасте 30—49 лет — 83% (95% ДИ 80,8—91,6), женщин было 12% (95% ДИ 6,2—20,5). Анализ социального статуса пациентов показал, что, несмотря на работоспособный возраст, в 91% (95% ДИ 83,0—95,9) они не работали, а 42% (95% ДИ 32,8—52,2) в течение от 2 до 4 лет находились в местах лишения свободы.

У 70% (95% ДИ 60,5—78,8) имелись клинические проявления туберкулёза лёгких, симптомы интоксикации в различных сочетаниях встречались практически у всех больных — кашель с мокротой отмечался в 94% (95% ДИ 84,2—98,2), одышка — 54% (95% ДИ 46,2—64,4), боли в грудной клетке — 30% (95% ДИ 21,2—39,5) и кровохарканье в 9% (95% ДИ 4,1—17,0) случаев.

Выявлено, что в целом эффективность лечения определялась характером процесса (то есть характером предыдущего лечения или его началом). Так, при окончании, в соответствии с рекомендуемыми сроками интенсивной фазы основного курса лечения в стационарных условиях, возбудитель прекратили выделять 27 (57,4%) из 47 впервые выявленных пациентов, 3 (20%) из 15 с рецидивом и 46 (47,9%) из 96 больных ФКТЛ с хроническим течением процесса. В целом же абациллирование на этом этапе лечения достигнуто у 76 (48,1%) больных, что с учётом характера процесса и длительности его течения и лечения, является довольно успешным.

Одним из важных факторов риска неудач этиотропной терапии рассматривается приверженность пациентов лечению: если до начала терапии интенсивной фазы основного курса лечения (ИФ ОКЛ) показатели приверженности у больных первой и второй групп существенно не раз-

личались (соответственно 4,6 и 4,8 стенов, $p>0,05$), то их динамика после 3 месяцев лечения была иной: у пациентов, получивших циклоферон, отмечено повышение приверженности лечению. А у пациентов группы сравнения, особенно злоупотребляющих алкоголем, лишь уменьшился. Одновременно отмечались случаи недовольства результатами лечения, нарушений больничного режима и нерегулярного приёма препаратов. После окончания ИФ ОКЛ у пациентов, получивших терапию циклофероном, отмечен рост в 1,3 раза (с 4,6 до 6,0 стенов, $p>0,05$), в то время как в группе сравнения — снижение в 1,5 раз (с 4,8 до 3,2 стенов, $p>0,05$) (см. таблицу).

Проведена статистическая обработка и оценка влияния состояния больных на эффективность комплекса лечебно-реабилитационных мероприятий. Было установлено, что возраст пациентов существенно не влиял на результаты лечебно-реабилитационных мероприятий. Выявлена корреляционная связь между пребыванием больных в местах лишения свободы и рецидивами туберкулёза лёгких ($r=+0,174$). У этой же категории лиц выявлена положительная корреляция с частотой устойчивости к этиотропным препаратам ($r=+0,205$), в связи, с чем они чаще лечились по индивидуальному режиму ($r=+0,176$) и у них чаще обнаруживались побочные реакции на лечение ($r=+0,203$). Отмечено, что курение существенно не сказалось на результатах лечения, в то время как сопутствующие заболевания существенно снижали эффект лечения ($r=+0,156$) и отрицательно влияли на взаимоотношения с медицинским персоналом ($r=+0,171$). Выбор режима лечения тесно связан с характером туберкулёзного процесса по принципу прямой корреляции ($r=+0,858$), устойчивостью микобактерий к этиотропным препаратам ($r=+0,496$), сопутствующими заболеваниями ($r=+0,183$) и обратно связан с выраженностью приверженности лечению ($r=-0,395$). В целом эффективность лечения была связана с характером течения туберкулёза лёгких ($r=+0,272$) и зависела от сопутствующих заболеваний ($r=+0,196$) и интенсивности (частоты) побочных реакций ($r=+0,230$). Зарегистрирована зависимость приверженности лечению и применения циклоферона ($r=+0,435$), но её уровень резко снижался при малой эффективности лечения ($r=-0,852$), наличии сопутствующих заболеваний ($r=-0,308$), побочных реакций ($r=-0,203$), отсутствии эффекта от предыдущего курса лечения ($r=-0,265$) и экономи-

ческом неблагоприятии больного ($r=-0,244$). Сказывалось влияние состояния интоксикации больного и его настрой на лечение ($r=+0,830$). Высокая приверженность лечению прямо коррелировала с его эффективностью и была установлена при благоприятном течении туберкулёза у $100,0 \pm 1,6\%$ больных. Средний уровень приверженности сочетался с положительным эффектом лечения в $24,04 \pm 4,21\%$. При низкой приверженности у $83,33 \pm 11,24\%$ больных отмечено ухудшение клинического течения процесса.

Таким образом, проведённый анализ подтвердил влияние на эффективность лечебно-реабилитационных мероприятий большого количества факторов, из которых наиболее тесно связаны между собой: пребывание в местах лишения свободы и характер процесса, режим лечения, назначенный с учётом характера лекарственной устойчивости.

Установлена связь факторов, влияющих на эффективность лечения при включении в схему терапии циклоферона. Выявлена связь таких факторов, входящих в общий показатель приверженности лечению, как состояние психологического статуса, стресс, стигматизация и внушаемость.

Заключение

Результаты проведённого анализа подтверждают положение, что эффективность лечения у

больных фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких определяется не только характером течения, длительностью основного курса лечения, наличием лекарственной устойчивости возбудителя к противотуберкулёзным препаратам, но и целым рядом факторов, комплексно влияющих на приверженность пациентов лечению. Так, неблагоприятные исходы лечения этой формы заболевания наблюдаются у пациентов с хроническим течением заболевания ($F6=0,89$), обусловленным полирезистентным к противотуберкулёзным препаратам возбудителем ($F8=0,65$) а также среди лиц, освободившихся из мест лишения свободы ($F2=0,34$). Однако при этом даже кратковременное использование сопроводительной терапии циклофероном позволяет повысить эффективность лечения, улучшить течение процесса, включая прекращение выделения микобактерий у $94,1\%$ больных при наличии у них сопутствующих заболеваний.

Не исключено, что описанный эффект применения циклоферона в качестве терапии сопровождения обусловлен не только прямым его воздействием на иммунодефицит больного, но и опосредованно влиянием на повышение приверженности лечению за счёт прекращения нарушений режима лечения и других, чисто психологических факторов, требующих дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева И. А., Белюзовский Е. М., Борисов С. Е., Стерликов С. А. Заболеваемость, смертность и распространенность показатели бремени туберкулёза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 1. Заболеваемость и распространенность туберкулёза. Туберкулёз и болезни лёгких. — 2017. — Т. 95. — № 6. — С. 9—21. / *Vasilieva I.A., Belilovsky E.M., Borisov S. Ye., Sterlikov S.A.* Morbidity, mortality and prevalence rates of tuberculosis burden in WHO regions, countries of the world and in the Russian Federation. Part 1. Morbidity and prevalence of tuberculosis. Tuberculosis and lung diseases 2017; 95: 6: 9—21. [in Russian]
2. Касаева Т. Ч., Габбасова Л. А., Васильева И. А., Москалева А. А. Туберкулёз в Российской Федерации, 2012 / 2013 I 2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М.: 2015. — С. 11—22. / *Kasaeva T. Ch., Gabbasova L.A., Vasilieva I.A., Moskaleva A.A.* Tuberculosis in the Russian Federation, 2012/2013 I 2014. Analytical review of statistical indicators used in the Russian Federation and in the world, M.: 2015; 11—22. [in Russian]
3. Государственная программа Российской Федерации «Развитие здравоохранения», утверждена постановлением Правительства РФ №1640 от 26.12.2017. М.: 80. / The state program of the Russian Federation «Development of Health», approved by the Government of the Russian Federation № 1640 dated December 26, 2017. M.: 80.
4. Global Tuberculosis Report 2016. WHO/HTM/TB/2016.13. Geneva: World Health Organization, 2016
5. Нечаева О. Б., Стерликов С. А., Хуриева Н. Б. Целевые индикаторы и показатели государственной программы развития здравоохранения России до 2020 года. Туберкулёз и болезни лёгких. — 2014. — № 12. — С. 200—201. / *Nechaeva O.B., Sterlikov S.A., Khurieva N.B.* Target indicators and indicators of the state program of development of public health services of Russia up to 2020. Tuberculosis and lung diseases 2014; 12: 200—201. [in Russian]
6. Гельберг И. С., Вольф С. Б., Алексо Е. Н., Авласенко В. С., Коломиец В. М., Коноркина Е. А. Факторы риска развития туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Курский науч.-практич. вестн. «Человек и его здоровье». — 2015. — № 1. — С. 17—22. / *Gelberg I.S., Volf S.B., Alekso E.N., Avlasenko V.S., Kolomiets V.M., Konorkina E.A.* Risk factors for development of tuberculosis with multiple drug resistance of the pathogen. Kursk Scientific Center. — Pract. known. «Man and his health». 2015; 1: 17—22. [in Russian]
7. Приказ МЗ РФ № 951 от 29.12.2014 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулёза органов дыхания». М.: 2015. 40 с. [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 951 of 29.12.2014 «On the approval of methodological recommendations on» Improving the diagnosis and treatment of respiratory tuberculosis. M.: 2015; 40. [in Russian]
8. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулёза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя М.: 2015. — 52 с. / Federal Clinical Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Tuberculosis of the Respiratory System with Multiple and Extensively Drug Resistant M.: 2015; 52. [in Russian]
9. Способ повышения эффективности лечения больных туберкулёзом. Патент на изобретение №2611398. Россия. Регистрация в Государственном регистре изобретений РФ 21 февраля 2017 г. / Patent for invention RU № 2611398 «A way to improve the effectiveness of treatment of patients with tuberculosis. Registration in the State Register of Inventions of the Russian Federation on February 21, 2017. [in Russian]
10. Коломиец В. М., Рублева Н. В., Вольф С. Б., Демидик С. Н. Эффективность применения иммуномодуляторов в лечении деструктивных форм туберкулёза лёгких. Курский науч.-практич. вестн. «Человек и его здоровье». — 2013. — № 1. — С. 81—85. / *Kolomiets V.M., Rubleva N. V., Wolf S.B., Demidik S.N.* Efficiency of the use of immunomodulators in the treatment of destructive forms of pulmonary tuberculosis. Kursk scientific and practical «Man and his health». 2013; 1: 81—85. [in Russian]
11. Циклоферон в клинической пульмонологии: Пособие для врачей / Под ред. М. Г. Романцова. — СПб.: 2005. — 88 с. / Cycloferon in Clinical Pulmonology: A Manual for Physicians / Ed. M. G. Romantsova. St. Petersburg, 2005; 88. [in Russian]
12. Туберкулёз. Особенности течения, возможности фармакотерапии. Учебное пособие для врачей (под редакцией профессора А. К. Иванова) СПб.: 2009. — 108 с. / Tuberculosis. Features of the current, the possibility of pharmacotherapy. A manual for physicians (edited by Professor A. Ivanov) St. Petersburg, 2009; 108. [in Russian]

13. Патент на изобретение России RU № 2480206 «Способ иммунокоррекции основного курса лечения деструктивных форм туберкулёза лёгких» 27.04.2013. / Patent for the invention of Russia RU № 2480206

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Коломиец Владислав Михайлович — д. м. н., профессор кафедры фтизиопульмонологии, ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Курск

Рублева Наталья Владимировна — к. м. н., ассистент кафедры фтизиопульмонологии, ГБОУ ВПО «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,

«Method of immunocorrection of the main course of treatment of destructive forms of pulmonary tuberculosis» Registration in the State Register of Inventions of the Russian Federation on April 27, 2013.

ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Таликова Екатерина Владимировна — к. м. н. доцент кафедры морфологии, патологии и судебной медицины ЧОУ ВПО Санкт-Петербургский медико-социальный институт, Санкт-Петербург

Клинико-фармакологические аспекты резистентности к эрадикационной терапии инфекции *Helicobacter pylori*

С. Ю. СЕРЕБРОВА, А. Б. ПРОКОФЬЕВ, Н. Н. ЕРЕМЕНКО, М. В. ЖУРАВЛЕВА, Т. А. АЛЕКСАНДРОВА

Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, Москва

Clinical and Pharmacological Aspects of Resistance to Eradication Therapy of *Helicobacter Pylori* Infection

S. YU. SEREBROVA, A. B. PROKOFIEV, N. N. EREMNKO, M. V. ZHURAVLEVA, T. A. ALEXANDROVA

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow

Несмотря на доказанную эффективность в отношении *Helicobacter pylori* лекарственных препаратов, включенных в современные схемы эрадикационной терапии, проблема роста резистентности к ним микроорганизма актуальна не только для различных регионов Российской Федерации, но и имеет интернациональный и даже межконтинентальный характер. Статья посвящена современным представлениям о факторах патогенности *H. pylori*, распространённости и механизмах развития его резистентности к широко используемым для эрадикации антибиотикам, противоречиям между современными клиническими рекомендациями и Инструкциями по медицинскому применению по возможности, длительности использования тех или иных лекарственных препаратов в антихеликобактерных схемах и режимам их дозирования.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, резистентность, антибиотики, точечные мутации, метаболизм, лекарственные взаимодействия, Мaaстрхт V.

Despite the evidence of the effectiveness of modern medicines, which are included in modern schemes of eradication therapy, against *Helicobacter pylori*, the problem of growth of microorganism resistance to them is relevant not only for various regions of the Russian Federation; it also has an international and even intercontinental spread. The article presents modern information on *Helicobacter pylori* pathogenicity, the prevalence and development mechanisms of its resistance to antibiotics widely used for eradication, the contradictions in the information on indications, duration of use, anti-*Helicobacter pylori* treatment regimens and dosage in modern clinical guidelines and instructions for medical use.

Keywords: *Helicobacter pylori*, resistance, antibiotics, point mutations, metabolism, drug interactions, Maastricht V.

Helicobacter pylori является грамотрицательной неспорообразующей бактерией извитой формы, обитающей в слое слизи на поверхности желудка. Микроорганизм имеет 4—6 жгутиков на одном из концов, в неблагоприятных условиях формирует более устойчивые формы: функционально-активную почковидную, практически неподвижную гиперспирализированную и кокковую. Подвижности хеликобактера в слое слизи способствует муциназа, — фермент, деполимеризирующий гликопротеины муцина и снижающий вязкость среды. Наибольшее количество *H. pylori* определяется в межклеточных бороздках поверхностного эпителия желудка, что, в определённой степени, связывают с наибольшими здесь концентрациями мочевины и гемина.

Проникнув сквозь слой слизи, *H. pylori* прикрепляется к эпителиоцитам посредством S-подобного (S-like) и др. адгезинов. В адгезии микро-

организма также участвуют желудочные гликолипиды, сульфогалактозилцерамид, фосфотидилэтанолламин, ганглиотетраозилцерамид, рецепторы GM 3 и др. *H. pylori* проникает в межклеточные пространства, его сиалоокислый гемагглютинирующий лектин и гепарин-связывающие белки взаимодействуют с сиалированными и сульфатированными гликоконъюгатами в воспалённых тканях и клетках иммунной системы, активируется тканевой плазминоген, образуется плазмин. *H. pylori* может проникать в вакуоли эпителиоцитов в результате взаимодействия актинов жгутиков с фаголизосомами. Этим объясняется частое персистирование инфекции, несмотря на повторные курсы эрадикации.

В адгезии *H. pylori* участвуют также антигены групп крови Lewis (Le) и H-антиген. Антиген Le-b экспрессируется на поверхности эпителия желудка у лиц с положительным секреторным статусом, а у лиц, им необладающих, экспрессируется преимущественно Le-a, но некоторое количество Le-b сохраняется. Адгезия за счёт взаимодействия лиганда с рецептором Le-b травматична для кле-

© Коллектив авторов, 2018

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

ток: она приводит к разрушению микроворсинок и микрофиламентов, компенсаторной полимеризации актина апикальной мембраны, что способствует формированию адгезионного «пьедестала» с чашевидным ложем для бактерии, и усугубляет воздействие ферментов и токсинов на эпителиоцит.

Сейчас называется множество факторов патогенности *H. pylori*, активность которых может зависеть от полиморфизмов генов, их кодирующих: цитотоксичный CagA (способствует изменению цитоскелета эпителиальных клеток, формированию пьедестала адгезии *H. pylori*, стимулирует внутриклеточную сигнальную систему SHP-2, выработку провоспалительного IL-8, активирует рецептор эпителиального фактора роста (EGFR), регулирующий апоптоз, поддерживает воспаление, обладает мутагенными свойствами), VacA (вызывает вакуольную дегенерацию эпителиальных клеток, увеличивает проницаемость клеточных мембран для мелких молекул, регулирует трофические процессы микроорганизма, активирует процессы апоптоза), IceA (индуцирует контакт *H. pylori* с эпителием), BabA (обеспечивает адгезию микроорганизма к Le-b антигенам), HopQ, OipA, AhpC, NapA и другие цитотоксичные белки. Мембранные белки OMP (outer membrane proteins), — BabA, BabB, BabC, HPO227, OipA, AlpA, AlpB, SabA — обеспечивают адгезию и лучшую адаптацию микроорганизма в желудке хозяина. Изучаются также механизмы участия *H. pylori* в метилировании генов-супрессоров опухолевого роста.

Кислая среда желудка — сама по себе неблагоприятный фактор среды обитания. Поэтому наиболее часто *H. pylori* обнаруживается там, где процессы ощелачивания бикарбонатами преобладают над процессами секреции соляной кислоты, т.е. в антральном отделе желудка и в двенадцатиперстной кишке на участках слизистой оболочки, подвергшихся желудочной метаплазии. *H. pylori*, кроме того, может укрываться от повреждающих факторов в вакуолях эпителиоцитов. В желудке нового хозяина *H. pylori* адаптируется и противодействует иммунным механизмам элиминации благодаря мимикрии и генетической изменчивости как следствия интеграции генетического материала других штаммов *H. pylori*, обитавших там ранее. Кроме того, *H. pylori* не только взаимодействует с Lewis-антигенами, но и сам их экспрессирует, создавая различные липополисахаридные формы, имитирующие таковые Lewis-антигенов хозяина и позволяющие избежать элиминации микроорганизма. *H. pylori* производит, в зависимости от pH среды, две формы Lewis-антигена: Le-Y в нейтральной среде и Le-X в кислой [1, 2].

Наиболее авторитетным с научной точки зрения консолидирующим документом, касающим-

ся диагностики инфекции *H. pylori* и принципов выбора схемы антихеликобактерной терапии, является Маастрихтский консенсус V [3]. В эрадикационные схемы облигатно включаются ингибиторы протонной помпы в двойных суточных дозах (непредусмотренных Инструкциями по медицинскому применению, утверждённых в Российской Федерации) и препараты, обладающие антихеликобактерной активностью (препараты висмута, амоксициллин, кларитромицин, метронидазол, тетрациклин, левофлоксацин, рифабутин, фуразолидон), причём на их выбор влияет, во-первых, доказанная эффективность и сравнительная безопасность, во-вторых (если оценка возможна), отсутствие резистентности *H. pylori* к избираемому препарату у индивидуума и низкая резистентность в популяции данного региона ($\leq 15\%$ для кларитромицина; $\leq 40\%$ для метронидазола и $\leq 15\%$ для обоих препаратов). Кларитромицин и метронидазол являются эффективными и безопасными препаратами, но быстрый рост резистентности к ним в общемировом масштабе заставляет не столько изменить выбор антибактериальных средств, сколько уменьшать использование указанных препаратов по иным показаниям, off-label и при самолечении.

Уровни резистентности к антибактериальным средствам у *H. pylori* различны в разных регионах. Для исследователей имеют значение, прежде всего, показатели устойчивости микроорганизма в своих и соседних странах. Но с перспективной точки зрения важны аналогичные сведения из стран Африки, в которых принципиально иные социально-экономические условия, и антибиотики могут применяться по другим показаниям, что вызывает иную динамику частот резистентности к тем же препаратам. Эти данные позволят расширить представления о причинно-следственных связях между количеством случаев использования антибиотиков и уровнем/скоростью развития резистентности.

Устойчивость *H. pylori* к метронидазолу составляет от 31% до 53% в Европе и Южной Америке, от 64 до 80% в Иране и Саудовской Аравии [1, 4–6], и примерно 75,8% в Африке [1]. Причиной высокой резистентности в Африке, например, является частое использование этого препарата в лечении эндемических заболеваний, вызываемых бактериями и простейшими. При этом используемые низкие дозы метронидазола не способны обеспечить эрадикацию *H. pylori*, но увеличивают риск развития у микроорганизма резистентности [7, 8].

Устойчивость *H. pylori* к кларитромицину составляет в Северной Америке 30,8%, в Европе около 42,3%. В Африке распространённость резистентности неоднородна: от 0 — в Гамбии, Кении и Эфиопии до 100% — в Египте и Нигерии; в среднем, ре-

зистентность составляет 29,2% [2]. В странах Ближнего Востока устойчивость *H. pylori* к метронидазолу составляет 0—8% [6, 9]. По уточнённым данным за 2011—2017 годы резистентность *H. pylori* к кларитромицину составляла 73% в Китае, 58% — в Индии, 37% — в Южной Корее, 45% — в Иране, 28% — в Болгарии, 50% — в Португалии, 72% — в Италии, 16% — в Соединённых Штатах Америки [10].

Резистентность *H. pylori* к амоксициллину составляет от 0,35% в Европе, 2% — в Северной Америке, 6,6% — в Южной Америке, 23,6% — в Азии, до 72,6% — в Африке, где он является дешёвым и доступным препаратом как в городах, так и в сельской местности, и им повсеместно злоупотребляют [11].

Устойчивость *H. pylori* к тетрациклину составляет в Японии 0,01%, в Индии — 53,8%, в Африке — 49,8% [12]. В Европе, Северной и Южной Америках резистентность составляет, соответственно, 1,15%, 0 и 0 [4]. При этом высокий уровень резистентности в некоторых странах Азии и Африки объясняется широким применением препарата при лечении пневмоний, акне и инфекций, передающихся половым путём [13].

Показатель резистентности к фторхинолонам, наблюдаемый в Африке (16,2%) [14], приближается к таковому в Южной Америке (21%), Азии (25,3%) и Северной Америке (19%), но выше, чем в Европе (14,2%). Устойчивость к рифабутину составляет в Европе 1%, в Азии — 12,45% и не описана для остальных регионов. Резистентность к фуразолидону равна 0 в Северной Америке и 23% — в Азии [4].

Суммируя результаты российских исследований, можно сказать, что средний уровень резистентности штаммов *H. pylori*, выявленных в различных регионах за последние 10 лет, к кларитромицину составил 8,3%, к метронидазолу — 35,8%. То есть, уровень резистентности *H. pylori* к кларитромицину и метронидазолу в целом в стране низкий. Распространённость штаммов *H. pylori* с двойной устойчивостью к кларитромицину и метронидазолу низкая — в среднем 3,3% [15—19]. Однако в Москве резистентность *H. pylori* к кларитромицину с 1996 по 2005 год выросла с 0 до 19,3%, в Санкт-Петербурге с 2001 по 2012 год — с 13,3 до 36,7%. В исследовании, проведённом в 2014 г в г. Санкт-Петербург, оказалось, что резистентность к метронидазолу наблюдается у 42,5% штаммов *H. pylori*, к левофлоксацину — у 27,1%, к кларитромицину — у 25,0%, к амоксициллину — у 6,3%, к тетрациклину — у 0. Полирезистентность (нечувствительность к 3 и более антибиотикам) была выявлена у 11,1% штаммов [19].

Если не рассматривать фактор незначительной проницаемости среды обитания *H. pylori* и его изменённых форм для многих антибиотиков, т.е. проблему, вполне решаемую выбором конкретных антибактериальных препаратов и повыше-

ных их доз, причины резистентности *H. pylori* могут быть как генетически-обусловленными, так и ятрогенными. Если первые, облигатные, указывают на необходимость отказаться от препарата, эффективность которого от них зависит, то вторые — при адекватной оценке их значимости указывают, каким образом можно своими действиями не провоцировать утрату чувствительности *H. pylori* к тому или иному антибиотику.

Генетически обусловленными факторами резистентности микроорганизма чаще являются точечные мутации различных генов *H. pylori*.

Важным генетическим фактором макроорганизма, снижающим эффективность современных антихеликобактерных схем, является полиморфизм гена фермента CYP2C19, метаболизирующего ингибиторы протонной помпы с образованием неактивных метаболитов при первичном и последующих прохождениях через печень. Дело в том, что антибиотики эффективно действуют на активно размножающиеся микроорганизмы, а при высокой интенсивности кислотопродукции скорость репродукции *H. pylori* недостаточна для эффективной эрадикации. Так, показано, что продуцирующий аммиак *H. pylori* начинает активно размножаться при повышении среды $\text{pH} \geq 4$ [20]. Применяя ингибиторы протонной помпы в определённых суточных дозах, мы рассчитываем на высокий уровень ощелачивания внутрижелудочного содержимого, то есть на синергизм лекарственных препаратов разных фармакологических групп в отношении патогена. Скорость образования неактивных метаболитов нормальная у носителей аллелей дикого типа (CYP2C19*1) в гомозиготном состоянии и медленная у носителей мутантных аллелей CYP2C19*2 и CYP2C19*3 в различных вариантах генотипа, и у таких больных эффективная кислотосупрессия достигается при строгом выполнении существующих рекомендаций, но у ультрабыстрых метаболизаторов (CYP2C19*17/*17) интенсивное образование неактивных метаболитов ведёт к значительному снижению биодоступности ингибиторов протонной помпы и невозможности оптимизации репродуктивной функции микроорганизма, необходимой для эффективного воздействия на него антибиотиков [21]. Фармакогенетическая группа Нидерландов, например, для ультрабыстрых метаболизаторов рекомендовала повысить суточную дозу эзомепразола в эрадикационной схеме на 50—100% [22].

Ятрогенными факторами резистентности являются: частое применение антибиотиков, иногда при отсутствии показаний, низкая комплаентность у пациентов, короткие сроки эрадикационной терапии, наличие антибиотиков в сельскохозяйственной продукции, применение некачественных антибиотиков, антисекреторных препаратов (или их использование в низких дозах),

выбор антибиотика без учёта индивидуальной чувствительности к нему *H.pylori* у пациента (требуются дорогостоящие исследования, рутинно не выполняющиеся) или уровня резистентности микроорганизма в популяции данного региона, лекарственные взаимодействия.

Развитие резистентности *H.pylori* к антибиотикам в определённой степени зависит от экономических условий в государстве. Так, в развивающихся странах наблюдается низкая резистентность к кларитромицину, так как, в отличие от доступного амоксициллина, он в здесь просто не производится. С другой стороны, применение кларитромицина и резистентность к нему *H.pylori* в Японии с 1993 по 2000 гг. увеличились в 4 раза [14]. Но в Нидерландах на фоне роста потребления кларитромицина резистентность к нему *H.pylori* низкая. Вероятно, это связано с политикой рационального использования антибактериальных средств, и, несмотря на рост количества назначений кларитромицина, оно (как и других антибиотиков) здесь самое низкое среди стран Европейского Союза.

Существует несколько механизмов формирования приобретённой резистентности к кларитромицину [2, 23]:

- модификация мишени (метилование рибосом, мутации в рРНК, мутации в рибосомальных белках L4, L16, L22);
- активное выведение антибиотика из бактерии;
- ферментативная инактивация.

Основной причиной формирования резистентности являются точечные хромосомные мутации, приводящих к замене нуклеотидов в различных участках 23S рРНК [2]. Наиболее часто формируют резистентность к макролидам мутации в регионе пептидилтрансферазы домена V гена 23S рРНК, приводящие к нарушению связывания антибиотика с мишенью. Наиболее распространённые точечные мутации — A2143G (69,8%) и A2142G (11,7%), которыми обусловлены более 80% случаев резистентности к кларитромицину. Другие мутации, такие как A2142C, A2115G, G2141A, T2717C, A2115G, G2141A и A2142T, встречаются реже [4, 21]. В качестве вероятных причин развития резистентности *H.pylori* к кларитромицину называют также T2182C, C2611A, C2147G, G1939A, T1942C, C2195T (обнаруживается совместно с A2143G), A2144T, T2269G, T2221C, C2695G, T1944C, T2190C (обнаруживается совместно с A2143G+T2182C), C2195T, A2223G [2].

Большинство исследователей придерживается мнения, что точечные мутации возникают у ранее чувствительных микроорганизмов, а не вследствие обмена генетическим материалом между штаммами [2]. Причём, поскольку мутагенез запускается уже при первом контакте *H.pylori*

с кларитромицином, резистентные штаммы формируются, вероятно, ещё в детском возрасте, когда ещё нет гастроэнтерологических проблем, но кларитромицин часто назначается в связи с заболеваниями верхних дыхательных путей. В большинстве случаев ген с одной и той же точечной мутацией обнаруживается в гомозиготном состоянии. Редкая распространённость гетерогенности штамма отражает высокую эффективность ДНК-рекомбинации, когда мутация в одной переходит на вторую спираль 23S рРНК, что приводит к развитию резистентности высокого уровня к кларитромицину. Другой возможный механизм развития резистентности к кларитромицину — изменения функциональной активности системы эффлюксных насосов микроорганизма. Сейчас описано, по меньшей мере, 4 генных кластера эффлюксных насосов у *H.pylori*, и возможно, они выполняют синергичную с описанными точечными мутациями функцию в формировании нечувствительности микроорганизма к макролиду. У одного и того же пациента может быть несколько штаммов с разной чувствительностью к кларитромицину, у одного и того же штамма *H.pylori* может быть несколько мутаций, ассоциированных с резистентностью к данному макролиду [10].

По какой-то причине показатели резистентности *H.pylori* выше у женщин, чем у мужчин, а также выше при неязвенной диспепсии, чем при язвенной болезни [14].

Следует помнить, что кларитромицин — самый кислотонеустойчивый антибиотик, применяемый при эрадикации инфекции *H.pylori*: он нестабилен в кислой среде желудка при pH<4; при pH=2 период его полураспада составляет $1,3 \pm 0,05$ ч [24]. Поэтому ингибиторы протонной помпы применяются не только с целью повышения репродуктивной активности микроорганизма, делающей его более доступным действию антибиотиков, но и с целью предотвратить снижение абсорбции и эффективности кларитромицина. Ингибитор протонной помпы, приобретаемый пациентом в сомнительных источниках (интернет-аптеках, например), может оказаться фальсификатом, невзаимозаменяемым препаратом или препаратом с кишечнорастворимой оболочкой низкого качества. Обеспечиваемые такими ингибиторами протонной помпы низкие уровни защелачивания внутрижелудочного содержимого не позволяют развиваться должной антихеликобактерной активности кларитромицина [24].

Кларитромицин — субстрат CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP2C19 и фермента-переносчика Р-гликопротеина (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01211>), поэтому вероятные полиморфные варианты генов метаболических энзимов, увеличивающие скорость биотрансформации, и гена указанного транспортера ABCB1 (MDR1), повышающие его экспрессию, могут участвовать в развитии

резистентности к кларитромицину. Сейчас наиболее полно описано влияние генетического полиморфизма CYP2C19 на результаты эрадикации с применением схемы, содержащей кларитромицин, но основной акцент делается на влияние полиморфизма на биодоступность ингибиторов протонной помпы — тоже субстратов CYP2C19, но не макролида.

Сильными индукторами CYP3A4, стимулирующими метаболизм кларитромицина с образованием неактивных метаболитов и, таким образом, снижающих его биодоступность, являются вемурафениб, карбамазепин, невирапин, примидон, рифабутин, рифампицин, топирамат, фенитоин, фенобарбитал, энзалутамид (<https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT002649>). Доказанным индуктором CYP3A5 и CYP3A7 является эфавиренз (<https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT003900>, <https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT003899>). Сильными индукторами Р-гликопротеина являются карбамазепин и рифампицин (<https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT002666>). Индуцируют как CYP3A4, так и Р-гликопротеин лекарственные препараты и активно употребляемые населением травяные сборы, БАД и т.д., производящиеся на основе сырья Зверобоя продырявленного (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01323>), а также витамины [33]. Сама инфекция *H. pylori* — причина повышенной экспрессии Р-гликопротеина, что может рассматриваться как защитный механизм от действия цитотоксических веществ, выделяемых бактерией [25].

Называют несколько механизмов развития резистентности *H. pylori* к метронидазолу: снижение проницаемости бактерии и повышение эффлюкса для нитроимидазолов, индукция ферментов системы репарации ДНК, увеличение абсорбции кислорода, блокада энзимов, участвующих в биотрансформации метронидазола в бактериальной клетке [4]. Основной причиной развития резистентности к метронидазолу называют возникновение точечной мутации гена *rdx* (*RdxA*), кодирующего кислород-нечувствительную НАДФН-нитроредуктазу [26, 27]. Такой же причиной считают мутацию *FrxA* [1].

Метронидазол является субстратом CYP2C9, CYP3A4, для которых генетические полиморфизмы, определяющие быстрый тип метаболизма, не рассматриваются (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00916>). Однако при совместном применении с индукторами CYP2C9 (бозентан, дексаметазон, карбамазепин, нифедипин, примидон, ритонавир, рифампицин, фенитоин, фенобарбитал, циклофосфамид) или индукторами CYP3A4 (см. выше) (<https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT002637>, <https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT001245>) биодоступность метронидазола может снижаться.

Резистентность к амоксициллину у *H. pylori*, в целом, встречается редко, за исключением стран

Африки, что было описано выше. У небольшого количества резистентных штаммов была обнаружена мутация в гене *rbp1A*. Так же говорят о возможности участия повышенной интенсивности работы эффлюкс-помп и замены серина на аргинин в пенициллин-связывающем белке в развитии резистентности [4, 26]. Устойчивость к амоксициллину чаще выражается в возрастании минимальной подавляющей концентрации препарата (МПК) с 0,03 до мг/л до 0,25—0,5 мг/л [28].

Амоксициллин является субстратом CYP2C19, поэтому обусловленная генетически высокая скорость метаболизма (генотип CYP2C19*17/*17), равно как и применение индукторов CYP2C19 (см. выше) могут снижать биодоступность амоксициллина (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01060>). Что касается кислотонестойчивости препарата, она имеется, но скорость полураспада препарата в сильноокислой среде намного превышает время его пребывания в желудке. Однако этот факт не снижает необходимости применять качественные блокаторы кислотопродукции в эрадикационных схемах.

Тетрациклины действуют на синтез белка, связываясь с 30S субъединицей рибосом. Резистентность к тетрациклину связывают с изменением нуклеотидного триплета AGA-926 на 928 g → (стрелка вправо) TTC, сходного с изменением в позиции 965 g → (стрелка вправо) 967, что приводит к модификации мишени для связывания тетрациклинов — петли h1. Одиночная или двойная мутация в этих позициях приводят к формированию промежуточных значений МПК. Необходимость наличия трёх замен нуклеотидных оснований объясняет сравнительно редкую встречаемость резистентности *H. pylori* к тетрациклину [28].

Тетрациклин — субстрат CYP3A4, и применение его индукторов (см. выше) может привести к снижению биодоступности тетрациклина (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00759>).

Мишенью фторхинолонов является субъединица А ДНК-гиразы, кодируемая геном *gyrA*, ответственная за суперспирализацию ДНК. Резистентность *H. pylori* связывают с изменениями нуклеотидных последовательностей в этом гене в позиции 87 или 91 [28].

Левоефлоксацин — субстрат Р-гликопротеина, и применение его индукторов (см. выше) может привести к снижению биодоступности препарата (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01137>).

Рифамицины ингибируют субъединицу В ДНК-зависимой РНК-полимеразы, кодируемой геном *groB*. Описаны мутации этого гена в позициях 149, 524, 525, 585, которые могут вызывать резистентность к рифабутину, но она практически не встречается в связи с ограниченным использованием препарата при эрадикационной терапии [28].

Лекарственные формы амоксициллина, кларитромицина, метронидазола, висмута трикалия дицитрата, левофлоксацина, рифабутина, зарегистрированные в РФ

Название лекарственной формы	Наличие информации о <i>H. pylori</i> в спектре действия утверждённой Инструкции по медицинскому применению	Наличие показания к применению в отношении эрадикации <i>H. pylori</i> в утверждённой Инструкции по медицинскому применению	Длительность применения, согласно утверждённой Инструкции по медицинскому применению
Амоксициллин			
Таблетки диспергируемые 125, 250, 500, 1000 мг	Присутствует	Возможно применение у детей до 1 года и взрослых	7 дней
Капсулы 250, 500 мг, Таблетки 250, 500 мг, Таблетки, покрытые плёночной оболочкой 500, 1000 мг	Присутствует	Возможно применение у детей с 3 лет и взрослых	7 дней
Кларитромицин			
Таблетки, покрытые плёночной оболочкой 250, 500 мг	Присутствует с 12 лет и взрослых	Возможно применение у детей 7—14 дней	
Гранулы для приготовления суспензии для приёма внутрь, Порошок для приготовления суспензии для приёма внутрь, Лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, Таблетки пролонгированного действия, покрытые оболочкой, Таблетки с пролонгированным высвобождением покрытые плёночной оболочкой	Присутствует	Отсутствует	—
Метронидазол			
Таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 250, 500 мг	Присутствует	Возможно применение у детей с 6 лет и взрослых	Длительность не указана
Суппозитории вагинальные 500 мг	Присутствует	Отсутствует в Показаниях	—
Висмута трикалия дицитрат			
Таблетки, покрытые оболочкой, 120 мг	Присутствует	Возможно применение у детей с 4 лет и взрослых	4—8 недель
Левофлоксацин			
Таблетки, покрытые плёночной оболочкой 250, 500 мг, 750 мг Раствор для инфузий 5 мг/мл	Присутствует	Отсутствует в Показаниях	—
Рифабутин			
Капсулы 150 мг	Отсутствует	Отсутствует	—

Рифабутин является субстратом CYP3A4, CYP1A2, и применение их индукторов может привести к снижению биодоступности рифабутин. Индукторы CYP3A4 — см. выше; индукторы CYP1A2: карбамазепин, монтелукаст, примидон, рифампицин (возможность одновременного применения с рифабутином сомнительна), фенитоин, фенобарбитал (<https://www.drugbank.ca/categories/DBCAT000614>).

Нитрофураны, являющиеся акцепторами кислорода, нарушают клеточное дыхание бактерий и ингибируют синтез нуклеиновых кислот. Идентифицировано 6 мутаций в генах *rodD* и *oorD*, с которыми ассоциируют резистентность *H. pylori* к фуразолидону [28].

Сведений о метаболизме фуразолидона с помощью изоферментов цитохрома P450, так же как об энзимном транспорте препарата каким-либо из известных переносчиков, не найдено (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00614>).

Практикующему доктору трудно, а порой и невозможно предотвратить резистентность *H. pylori*, вызванную генетически-обусловленными и, частично, ятрогенными факторами. Однако при назначении ингибиторов протонной помпы и препаратов, обладающих антибактериальной активностью лучше иметь в виду ряд мало учитываемых факторов.

Во-первых, лучше назначать взаимозаменяемые препараты. Оценка взаимозаменяемости, регламентируется в Российской Федерации Статьей 27.1. «Порядок определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения» Федерального закона от 12.04.2010г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» в ред. Федерального закона от 22.12.2014 г. № 429-ФЗ. Данный законодательный акт предлагает достаточно широкую трактовку критериев взаимозаменяемости, но при этом множество лекарственных препаратов при-

знано невзаимозаменяемыми. В случае возникновения правовых коллизий даже при возникшей в детстве резистентности к кларитромицину персистирующего у пациента *H. pylori* доктору будет сложно объяснить, почему он назначил невзаимозаменяемый кларитромицин. Сведения о взаимозаменяемости можно получить на портале Государственного реестра лекарственных средств (<https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=>).

Во-вторых, некоторые положения Рекомендаций «Маастрихт V» подлежат обсуждению, так как они не согласуются с утверждёнными Инструкциями по медицинскому применению лекарственных препаратов. Так, рекомендованная схема квадротерапии с препаратами висмута или без них предполагает 14-дневный курс лечения. Однако продолжительность применения амоксициллина по показанию «Эрадикация *Helicobacter pylori*», согласно Инструкции, ограничена семью днями (таблица).

Следует обратить внимание и на отсутствие упоминания *H. pylori* в показаниях Инструкций по медицинскому применению препаратов левофлоксацина и риабутина, таким образом, их назначение по Рекомендациям «Маастрихт V», является off-label в Российской Федерации и в странах со строгими регуляторными требованиями, например, в США (FDA) и Великобритании [29–32].

При назначении антибактериального препарата следует обращать внимание на лекарственную форму. В таблице перечислены лекарственные формы препаратов амоксициллина, кларитромицина, метронидазола, висмута трикалия дигидрата, левофлоксацина и рифабутина, по данным Государственного реестра лекарственных средств Минздрава РФ на июнь 2018 г. Несмотря на присутствие в спектре действия кларитроми-

цина *H. pylori*, что указано во всех Инструкциях по медицинскому применению для всех зарегистрированных лекарственных форм препарата, показание «Эрадикация *Helicobacter pylori*» есть только у таблеток, покрытых плёночной оболочкой.

В процессе принятия решения о назначении антибактериального препарата врач должен, прежде всего, руководствоваться предписаниями официально утверждённых Инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов, используя для этого официальную информацию, размещённую на портале Государственного реестра лекарственных средств (<https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx?s=>). Предписания Консенсуса «Маастрихт V» носят лишь рекомендательный характер, и их правовой статус не подкреплён законодательно.

Заключение

Используя клинико-фармакологические подходы к анализу данных о механизмах развития и текущих уровнях резистентности *H. pylori* к антибактериальным препаратам, можно оптимизировать рекомендации по повышению эффективности эрадикационной терапии, но подходы к её выбору должны быть основаны не только на изменяющейся чувствительности к тому или иному антибактериальному препарату, но и, в первую очередь, на требованиях утверждённых в РФ Инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Jaka H., Rhee J.A., Östlundh L. et al. The magnitude of antibiotic resistance to *Helicobacter pylori* in Africa and identified mutations which confer resistance to antibiotics: systematic review and metaanalysis. BMC Infect Dis 2018; 18: 193.
2. Саблин О.А., Ильчишина Т.А. Проблема резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину. Гастроэнтерология (приложение Consilium medicum). — 2009. — № 2. — С. 4–8. / Sablin O.A., Il'chishina T.A. Problema rezistentnosti *Helicobacter pylori* k klaritromitsinu. Gastroenterologiya (prilozhenie Consilium medicum). 2009; 2: 4–8.
3. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut 2016; 0: 1–25.
4. Ghotaslou R., Leylbadlo H.E., Asl Y.M. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a recent literature review. World J Methodol 2015; 5 (3): 164–174.
5. Khademi F., Poursina F., Hosseini E. et al. *Helicobacter pylori* in Iran: a systematic review on the antibiotic resistance. Iran J Basic Med Sci 2015; 18 (1): 2.
6. Hunt R., Xiao S., Megraud F. et al. *Helicobacter pylori* in developing countries. World gastroenterology organisation global guideline. J Gastrointest Liver Dis 2011; 20 (3): 299–304.
7. Glupczynski Y., Megraud F., Lopez-Brea M., Andersen L. European multicenter survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20 (11): 820–823.
8. Frenck R.W., Clemens J. *Helicobacter* in the developing world. Microbes Infect 2003; 5 (8): 705–713.
9. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 2004; 53 (9): 1374–1384.
10. Abadi T.B. Resistance to clarithromycin and gastroenterologist's persistence roles in nomination for *Helicobacter pylori* as high priority pathogen by World Health Organization. World J Gastroenterol 2017; 23 (35): 6379–6384.
11. Gebeyehu E., Bantie L., Azage M. Inappropriate use of antibiotics and its associated factors among urban and rural communities of Bahir Dar city administration, Northwest Ethiopia. PLoS One 2015; 10 (9): e0138179.
12. Giorgio F., Principi M., De Francesco V. et al. Primary clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*: is this the main reason for triple therapy failure. World J Gastrointest Pathophysiol 2013; 4 (3): 43–46.
13. Organization W.H. Guidelines for the management of sexually transmitted infections. Geneva: WHO; 2001. In: WHO/HIV/AIDS/2001, 01. 2008. Available from <http://www.who.int/hiv/pub/sti/en/STIGuidelines2003.pdf>. Accessed 20 July 2006.
14. De Francesco V., Giorgio F., Hassan C. et al. Worldwide *H. pylori* Antibiotic Resistance: a Systematic Review. J Gastrointest Liver Dis 2010; 19 (4): 409–414.
15. Поздеев О.К., Морозова Л.Г., Поздеева А.О. и др. Мониторинг первичной антибиотикорезистентности штаммов *Helicobacter pylori*, выделенных в Республике Татарстан в 2008–2013 гг. Клин микробиол антимикроб химиотер. — 2016. — № 2. — С. 146–151. / Pozdeev O.K., Morozova L.G., Pozdeeva A.O. i dr. Monitoring pervichnoy antibiotikorezistentnosti shtamov *Helicobacter pylori*, vydelenykh v Respublike Tatarstan v 2008–2013 gg. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2016; (2): 146–151. [in Russian]
16. Дехнич Н.Н., Костякова Е.А., Пунин А.А. и др. Антибиотикорезистентность *H. pylori*: результаты микробиологического регионально-

- го исследования. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. — 2011. — Т. 21. — № 2. — С. 37–42. / *Dekhnich N.N., Kostyakova E.A., Punin A.A. i dr. Antibiotikorezistentnost' H.pylori: rezul'taty mikrobiologicheskogo regional'nogo issledovaniya. Ros zhurn gastroenterol gepatol koloproktol* 2011; 21 (2): 37–42. [in Russian]
17. *Дехнич Н.Н., Иванчик Н.В., Козлов Р.С. и др. Чувствительность штаммов H.pylori к антимикробным препаратам в г. Смоленске в 2015–2016 гг. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. — 2016. — № 6. — С. 24–31. / Dekhnich N.N., Ivanchik N.V., Kozlov R.S. i dr. Chuvstvitel'nost' shtammov H.pylori k antimikrobnym preparatam v g. Smolenske v 2015–2016 gg. Ros zhurn gastroenterol gepatol koloproktol* 2016; 6: 24–31. [in Russian]
 18. *Саблин О.А., Михайлов Н.В., Юрин М.В. и др. Первичная резистентность Helicobacter pylori к антибиотикам в Санкт-Петербурге. Экспер клин фармакол. — 2012. № 8. — С. 18–23. / Sablin O.A., Mikhaylov N.V., Yurin M.V. i dr. Pervichnaya rezistentnost' Helicobacter pylori k antibiotikam v Sankt-Peterburge. Ekspert klin farmakol* 2012; 8: 18–23. [in Russian]
 19. *Симаненков В.И., Захарова Н.В., Жебрун А.Б. и др. Резистентность Helicobacter pylori к антимикробным препаратам по результатам бактериологического тестирования. Леч врач. — 2015. — № 4. — С. 91–95. / Simanenkov V.I., Zakharova N.V., Zhebrun A.B. i dr. Rezistentnost' Helicobacter pylori k antimikrobnym preparatam po rezul'tatam bakterio-logicheskogo testirovaniya. Lech vrach* 2015; (4): 91–95. [in Russian]
 20. *Sachs G. Gastric Infection by Helicobacter pylori. Curr Gastroenterol Rep* 2011; 13 (6): 540–546.
 21. *Peng X., Song Zh., He L. et al. Gastric Juice-Based Real-Time PCR for Tailored Helicobacter Pylori Treatment: A Practical Approach. International J Med Sci* 2017; 14 (6): 595–601.
 22. *Dean L. Esomeprazole Therapy and CYP2C19 Genotype. Med Gen Sum* 2012; Last Update: March 8, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100896/>
 23. *Leclercq R., Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in Streptococcus pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother* 2002; 9: 2727–2734.
 24. *Erah P.O., Goddard A.F., Barrett D.A. et al. The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of Helicobacter pylori infection. J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 5–12.
 25. *Денисенко Н.П. Оптимизация фармакотерапии больных с язвенной болезнью на основе фармакогенетического тестирования — Дисс канд мед наук. — М.: 2018. / Denisenko N.P. Optimizatsiya farmakoterapii bol'nykh s yazvennoy boleznyu na osnove farmakogeneticheskogo testirovaniya — Diss kand med nauk. M.: 2018. [in Russian]*
 26. *Iwamoto J. Expressions of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and plasminogen activator inhibitor-1 in gastric cancer cells and effects of Helicobacter pylori. Scand J Gastroenterol* 2005; 40 (7): 783–793.
 27. *Kato S., Fujimura Sh., Udagawa H. et al. Antibiotic Resistance of Helicobacter pylori Strains in Japanese Children. Clin Microbiol* 2002; 649–653.
 28. *Исаева Г.Ш. Резистентность H.pylori к антибактериальным препаратам и методы ее определения. Клинико-микробиологический химический журнал. — 2010. — Т. 12. — № 1. — С. 57–66. / Isaeva G.SH. Rezistentnost' H.pylori k antibakterial'nym preparatam i metody ee opredeleniya. Klin mikrobiol antimikrob khimioter* 2010; 12 (1): 57–66. [in Russian]
 29. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020634s068,020635s074,021721s0351bl.pdf
 30. <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/spcpil/documents/spcpil/con1487312104892.pdf>
 31. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/050689s0221bl.pdf
 32. <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/spcpil/documents/spcpil/con1459313514484.pdf>
 33. *Ших Е.В., Махова А.А., Шумянцев В.В., Демидова О.А. Фармакологическая регуляция активности изоферментов цитохромов P450 3A4 и P450 2C9 витаминами и природными соединениями. Вестник НЦЭСМП. — 2016. — № 4. — С. 42–47. / Shikh E.V., Makhova A.A., Shumyantseva V.V., Demidova O.A. Farmakologicheskaya regulyatsiya aktivnosti izofermentov tsitokhromov P450 3A4 i P450 2C9 vitaminami i prirodnyimi soedineniyami. Vedomosti NTSESMP* 2016; 4: 42–47. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Серебров Светлана Юрьевна — д. м. н., главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Прокофьев Алексей Борисович — д. м. н., профессор, директор Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Еременко Наталья Николаевна — эксперт I категории Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Журавлева Марина Владимировна — д. м. н., профессор, зам. директора Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Александрова Татьяна Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва

Анализ эффективности, рациональности и безопасности периперационной профилактики у пациентов хирургического профиля в многопрофильном стационаре

Т. Е. МОРОЗОВА, *М. В. ЛУКИНА, Т. Б. АНДРУЩИШИНА, М. А. ЧУКИНА

Первый московский государственный медицинский университет, Москва

Analysis of the Effectiveness, Efficiency, and Safety of Perioperative Prophylaxis in Surgical Patients in a Multidisciplinary Hospital

T. YE. MOROZOVA, *M. V. LUKINA, T. B. ANDRUSHCHISHINA, M. A. CHUKINA

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

Цель — оценить эффективность, рациональность, и безопасность применения антибактериальных препаратов (АБП) с целью периперационной профилактики (ПАП) инфекционных осложнений у пациентов хирургических отделений в многопрофильном стационаре. **Материал и методы.** Проведён фармакоэпидемиологический анализ 576 историй болезней пациентов в возрасте от 18 до 87 лет (средний возраст составил ($M \pm \sigma$) $57,4 \pm 14,5$), мужчин — 347 (60,2%), женщин — 229 (39,8%) после хирургических вмешательств. Анализовали частоту и характер инфекционных осложнений, рациональность выбора антибактериальной терапии, частоту развития неблагоприятных побочных реакций (НПР). Статистический анализ данных проводился с использованием пакета программ статистического анализа STATISTICA 10.0 («StatSoftInc.», США). **Результаты.** Выбор схем ПАП соответствовал рекомендациям в 207 (35,9%) случаях. Выявлен высокий уровень несоблюдения рекомендаций по проведению периперационной профилактики (47,6%) и нарушения сроков проведения ПАП (76,2%). Общее число случаев нарушения режимов дозирования составило 225 случаев (39,1%). Частота инфекционных осложнений в послеоперационном периоде составила $n=90$ (15,6%). Выявлены взаимосвязи нерациональных схем ПАП с длительностью пребывания в ОРИТ ($p=0,003$); нарушений режимов дозирования АБП — с частотой повторных оперативных вмешательств, ассоциированных с инфекцией ($p=0,001$); длительностью пребывания в ОРИТ ($p=0,005$); уровнем летальности ($p=0,002$) и выделением полирезистентных штаммов ($p=0,016$). Нарушение функции почек является самостоятельным неблагоприятным предиктором развития НПР ($p<0,0001$), развития инфекционных осложнений ($p=0,006$), длительности пребывания в ОРИТ ($p=0,049$), длительности госпитализации ($p<0,001$) и летального исхода ($p=0,003$). **Выводы.** У пациентов хирургического профиля в условиях реальной клинической практики сохраняется высокий уровень несоблюдения рекомендаций по проведению периперационной профилактики, нарушения сроков проведения ПАП и нарушения режимов дозирования АБП, что негативно сказывается на госпитальных показателях (увеличение летальности, длительности пребывания в ОРИТ, частоты повторных оперативных вмешательств, ассоциированных с инфекцией) и повышает риск развития НПР.

Ключевые слова: антибактериальные препараты, периперационная профилактика инфекционных осложнений хирургического вмешательства, рациональность применения, эффективность, нежелательные побочные реакции.

Objective. To evaluate the effectiveness, rationality, and safety of the use of antibacterial medications for the purpose of perioperative prophylaxis (POP) of infectious complications in patients of surgical departments in a multidisciplinary hospital. **Materials and methods.** A pharmacoepidemiological analysis of 576 case histories of patients aged from 18 to 87 years old (average age was ($M \pm \sigma$) 57.4 ± 14.5), of which 347 (60.2%) were male and 229 (39.8%) — female, after surgical interventions was carried out. The frequency and nature of infectious complications, the rationality of the choice of antibiotic therapy, the incidence of adverse reactions were analyzed. Statistical analysis of the data was carried out using the statistical analysis software package STATISTICA 10.0 (StatSoftInc., USA). **Results.** The choice of POP schemes corresponded to the recommendations in 207 (35.9%) cases. A high level of non-compliance with the recommendations for perioperative prophylaxis (47.6%) and violations of the POP (76.2%) were revealed. The total number of cases of dosing regimens violation amounted to 225 (39.1%) cases. The frequency of infectious complications in the postoperative period was $n=90$ (15.6%). The study revealed the interrelationships of non-rational POP schemes with the length of stay in the ICU ($p=0.003$), violations of the antibiotic dosing regimens with the frequency of repeated surgical interventions associated with infection ($p=0.001$), the length of stay in the ICU ($p=0.005$), mortality rate ($p=0.002$), and isolation of multidrug-resistant strains ($p=0.016$). Renal impairment is an independent unfavorable predictor of the development of adverse reactions ($p<0.0001$), the development of infectious complications ($p=0.006$), the length of stay in the ICU ($p=0.049$), the length of hospitalization ($p<0.001$), and fatal outcome

($p=0.003$). *Conclusions.* Patients of surgical profile in real clinical practice maintain a high level of non-compliance with recommendations for perioperative prophylaxis, violation of POP periods and violation of antibiotic dosing regimens, which negatively affects hospital indicators (increased mortality, length of stay in ICU, frequency of repeated surgical interventions associated with infection) and increases the risk of adverse reactions development.

Keywords: antibacterial medications, perioperative prophylaxis of infectious complications of surgical intervention, rationality of use, effectiveness, adverse reactions.

Введение

В настоящее время проблема резистентности к АБП, приобретает особое значение, так как увеличивается число случаев развития инфекций, ассоциированных с полирезистентными штаммами бактерий. Специалисты по инфекционному контролю, в т. ч. Европейского Центра по контролю и профилактике заболеваний (ECDC) и Всемирной организации здравоохранения, обнародовали данные, свидетельствующие о высокой частоте инфекционных осложнений, ассоциированных с поли- и панрезистентными штаммами [1–3]. Данные отечественного эпидемиологического исследования ЭРГИНИ, свидетельствуют о высокой распространённости поли- и панрезистентной флоры в многопрофильных стационарах РФ [4].

Проблема растущей резистентности к АБП связана с различными факторами, ведущее значение среди которых имеют неоправданно высокая частота назначения и нерациональный выбор АБП, причём не только в условиях стационара, но и во внебольничной среде [5, 6]. Особую негативную роль играет использование нерациональных доз препаратов, прежде всего назначение субтерапевтических дозировок АБП, в том числе с профилактической целью [7, 8].

В РФ на основании постановления Правительства от 25.09.2017 № 2045 активно разрабатываются меры по сдерживанию роста антибиотикорезистентности. Согласно обновлённым рекомендациям национальной программы «Стратегия Контроля Антимикробной Терапией (СКАТ)», необходимо активно проводить мероприятия по сдерживанию роста антибиотикорезистентности и контролю за распространением нозокомиальных инфекций в условиях многопрофильных стационаров [9]. При этом важным инструментами реализации данной стратегии является проведение системного мониторинга распространения антибактериальной резистентности, изучение механизмов её возникновения и совершенствование мер по осуществлению контроля за оборотом антибактериальных препаратов [10].

Таким образом, одним из способов сдерживания роста антибиотикорезистентности является рациональное назначение АБП и разработка локальных протоколов по их при-

менению в лечебно-профилактических учреждениях в различных клинических ситуациях, в том числе для проведения периоперационной профилактики.

Внедрение мер по сдерживанию роста антибактериальной резистентности в условиях отдельно взятого многопрофильного стационара, требует проведения локальных фармакоэпидемиологических исследований по оценке рациональности, эффективности и безопасности применения АБП.

Цель исследования — оценить эффективность, рациональность, и безопасность применения (АБП) с целью периоперационной профилактики (ПАП) инфекционных осложнений у пациентов хирургического профиля в многопрофильном стационаре.

Материал и методы

Проведён фармакоэпидемиологический анализ структуры назначения АБП с профилактической целью у пациентов хирургического профиля, рациональности выбора схем ПАП и их соответствия национальным и международным клиническим рекомендациям [11–13].

В базу данных вносили клинико-демографические данные пациентов (пол, возраст, основное и сопутствующие заболевания, уровень креатинина, клиренса креатинина до и после оперативного вмешательства), информацию о характере оперативного вмешательства (в т.ч. объём кровопотери и тип операционных ран), наличие осложнений, случаи нежелательных побочных реакций (НПР), режим дозирования АБП для периоперационной профилактики [14, 15].

Для фармакоэпидемиологического анализа были отобраны 576 историй болезней пациентов после хирургических вмешательств в возрасте от 18 до 87 лет (средний возраст составил ($M \pm \sigma$) $57,4 \pm 14,5$), из них мужчин — 347 (60,2%), женщин — 229 (39,8%). Период анализа — с января 2016 по сентябрь 2016 г. Подробная характеристика выборки представлена в табл. 1.

Достоверных различий анализируемых показателей у мужчин и женщин не отмечено, за исключением индекса массы тела (ИМТ) ($p=0,005$), уровня креатинина до и после оперативного вмешательства и расчётного значения клиренса креатинина в послеоперационном периоде ($p<0,001$; $p=0,058$).

По профилю оперативных вмешательств можно выделить следующие группы: общая хирургия ($n=356$; 61,8%), кардиохирургия ($n=177$; 30,7%), онкохирургия ($n=21$; 3,6%). Большинству пациентов проводились плановые оперативные вмешательства ($n=468$; 81,3%).

Согласно классификации IACMAC, среди типов операционных ран преобладали чистые раны 310 (53%), что объясняется преобладанием пациентов кардиохирургического профиля. У 113 (19,6%) с гнойно-септическими заболеваниями различной локализации тип ран относили к инфицированным. Условно-чистые и контаминированные раны встречались в 70 (12,1%) и 84 (14,4%) случаев, соответственно.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, включённых в фармакоэпидемиологический анализ

Показатели	Всего	Мужчины, n=347		Женщины, n=229		p-value
	M±σ	M	σ	M	σ	
Возраст, лет	57,4±14,5	57,8	13,6	56,9	15,6	0,468
ИМТ, кг/м ²	28,2±5,67	27,7	4,8	29,01	6,8	0,005
Длительность госпитализации, сут.	18,1±22,05	17,2	10,7	19,6	32,4	0,197
Инфекционные осложнения, n (%)	90 (15,6)	52 (57,8)	38 (42,2)	0,543		
Сроки развития инфекционных осложнений, сут.	1,5±3,6	1,1	3,6	1,3	3,7	0,596
Сроки развития неинфекционных осложнений, сут.	0,89±4,39	0,88	2,7	0,90	6,2	0,942
Сроки повторных оперативных вмешательств, сут.	1,18±3,96	1,4	4,3	0,85	3,3	0,114
Длительность пребывания в ОРИТ, сут.	3,1±7,6	2,761	6,2	3,63	9,2	0,180
Длительность ИВЛ, сут.	0,61±4,12	0,3	2,67	1,04	5,6	0,041
Объём кровопотери, мл	214,1±483,1	169,9	426,7	243,3	515,5	0,074
Креатинин*, мг/дл	0,95±0,49	1,05	0,56	0,83	0,32	<0,0001
Креатинин**, мг/дл	1,07±0,94	1,13	0,76	0,98	1,16	0,058
Клиренс креатинина*, мл/мин	96,8±42,5	100,61	44,91	91,17	38,01	0,009
Клиренс креатинина**, мл/мин	74,79±52,21	76,32	48,79	72,48	57,03	0,401
НПР, n (%)	23 (3,9)	14 (60,9)		9 (39,1)		0,185
Летальный исход, n (%)	20 (3,4)	10 (50)		10 (50)		0,234

Примечание. * — уровень креатинина крови и клиренс креатинина (по формуле Кокрофта-Голта) до оперативного вмешательства; ** — уровень креатинина крови и клиренс креатинина (по формуле Кокрофта-Голта) через 24–48 ч после оперативного вмешательства; НПР — нежелательные побочные реакции на лекарственные препараты.

Таблица 2. Частота развития и характер инфекционных осложнений в послеоперационном периоде

Тип ран	Чистые, n=310	Условно-чистые, n=84	Контаминированные, n=70	Инфицированные, n=112
Проведение ПАП, n (%)	283 (91,3)	77 (91,6)	70 (100)	51 (45,7)
Инфекционные осложнения, n=90 (15,6%)	40 (14,1)	15 (19,5)	18 (27,1)	6 (11,7)
ИОХВ	15 (5,3)	6 (7,7)	12 (7,1)	4 (7,8)
НП	15 (5,3)	3 (3,8)	4 (5,7)	0
Сепсис	5 (1,7)	1 (1,2)	0	0
Прочие*	5 (1,7)	5 (6,9)	3 (4,2)	2 (3,9)

Примечание. * — ИЭ, ИМП, НТБ, интраабдоминальные инфекции.

Эффективность ПАП оценивали по следующим показателям:

- частота инфекционных осложнений хирургических вмешательств, в том числе при различных типах операционных ран (данные об инфекционных осложнениях оценивали только за период госпитализации);
- частота повторных оперативных вмешательств, ассоциированных с инфекцией.

Также оценивали частоту инфекционных осложнений, в том числе в области хирургического вмешательства, в послеоперационном периоде.

У больных с инфекционными осложнениями проводилась оценка результатов микробиологических исследований.

С целью оценки рациональности и безопасности проводимой ПАП анализировали: структуру назначения АБП (время введения, режим дозирования), рациональность выбора препаратов, использованных схем ПАП, длительность приёма АБП, частоту случаев нежелательных побочных реакций (НПР).

Дополнительно проведён анализ влияния различных факторов, таких как схемы ПАП, клинико-демографические особенности пациентов (возраст, пол, ИМТ, характер основного заболевания, функционального состояния почек, вид оперативного вмешательства, тип ран, объём кровопотери) на риск развития инфекционных осложнений, общую длительность госпитализации, длительность пребывания в ОРИТ, риск развития нежелательных побочных реакций (НПР), летальность.

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета программ статистического анализа STATISTICA 10.0 («StatSoft Inc.», США). Данные представлены в виде средних значений — M и стандартного отклонения — σ. При

выборе метода анализа брали во внимание нормальность распределения выборок, которую оценивали с помощью W-теста Шапиро-Уилка и однородность дисперсий, которую оценивали с помощью T-теста Фишера (при сравнении двух выборок). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (при статистической мощности $> 80\%$). Помимо корреляционного анализа, для сравнения двух независимых переменных непрерывного типа, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали U-тест Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова. Сравнение двух качественных независимых переменных производили с помощью двухстороннего F-теста Фишера, либо теста χ^2 .

Результаты и обсуждение

Показатели эффективности периоперационной профилактики. Частота инфекционных осложнений в послеоперационном периоде составила 15,6% ($n=90$), среди которых преобладали инфекции области хирургического вмешательства (ИОХВ) — $n=45$ (50%) и инфекции нижних дыхательных путей — $n=31$ (34,4%), в том числе нозокомиальная пневмония (НП) у 24 (77,4%) пациентов и нозокомиальный трахеобронхит (НТБ) у 7 (22,6%); сепсис — $n=7$ (7,7%), интраабдоминальные инфекции — $n=6$ (6,6%), инфекция мочевыводящих путей (ИМП) = 1 (0,9%), инфекционный эндокардит (ИЭ) — $n=1$ (0,9%). Частота инфекционных осложнений у пациентов с различными типами операционных ран представлена в табл. 2.

Таблица 3. Результаты микробиологических исследований у пациентов с инфекционными осложнениями

Микроорганизм	<i>n</i>	Раневое отделяемое	Отделяемое из дренажа	Пунктат/абсцесса	Пунктат/плевральный выпот	БАЛ	Кровь
Всего (абс., %)	120	80 (66,6)	11 (9,2)	6 (5)	3 (2,5)	10 (8,3)	10 (8,3)
Всего положительных результатов (абс.)	84	49	11	6	2	10	6
Гр+, абс.,%	31 (36,9)	18	3	2	2	2	4
MSSA	5	3	1	0	0	0	1
MRSA	11	6	1	1	0	1	2
MSSE	4	3	0	0	1	0	0
<i>Enterococcus</i> spp.	11	6	1	1	0	1	1
Гр-, абс.,%	53 (63,1)	31	8	4	—	8	2
Enterobacteriaceae БЛРС+	12	6	4	2	0	1	0
<i>Klebsiella pneumonia</i> БЛРС+	8	5	2	0	0	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carb+	4	1	1	0	0	1	1
НФГО*(абс.)	29	18	2	2	0	5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0	0	1	0	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> БЛРС+	5	4	0	0	0	1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Carb+	9	8	0	0	0	1	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	0	0	1	0	2	0
<i>Acinetobacter baumannii</i> Carb+	9	6	2	0	0	1	0

Примечание. * — неферментирующие грамотрицательные бактерии; БЛРС — бета-лактамазы расширенного спектра; Carb — карбапенемазы.

ПАП проводилась большинству пациентов с чистыми и условно-чистыми ранами — 91,3% и 91,6%, соответственно, на фоне которой частота инфекционных осложнений составила 14,1% и 19,5%, соответственно (табл. 2). В группах больных, которым не проводилась ПАП, в послеоперационном периоде не выявлено ни одного случая инфекционных осложнений.

Всем больным с контаминированными ранами проводилась ПАП, при этом частота инфекционных осложнений составила 27,1% ($n=18$).

В группе больных с инфицированными ранами первой особенностью являлось отсутствие достоверных данных о назначении пациентам ($n=61$; 54,3%) АБП для периоперационной профилактики (за 30–60 мин до операции), несмотря на назначение АБП в послеоперационном периоде. В данной группе частота инфекционных осложнений была преимущественно выше у пациентов, которым «условно» не проводилась периоперационная профилактика $n=9$ (18,3%).

Повторные оперативные вмешательства потребовались в 86 случаях (14,9%), из которых 32 (37,3%) случая были ассоциированы с инфекционными осложнениями, остальные 54 (62,7%) — не были ассоциированы с инфекционными осложнениями.

Анализ результатов микробиологических исследований у пациентов с инфекционными осложнениями в послеоперационном периоде. В группе пациентов с развившимися инфекционными осложнениями ($n=90$) проведён анализ структуры госпитальных штаммов. В анализ включено 120 образцов микробиологического исследования. Результаты представлены в табл. 3. Преобладали посевы раневого отделяемого ($n=80$; 66,6%), отделяемое из дренажа — 11 (9,2%),

кровь — 10 (8,3%), БАЛ — 10 (8,3%), содержимое абсцесса — 6 (5%), содержимое плевральной полости — 3 (2,5%).

Соотношение грамположительных (Гр+) и грамотрицательных (Гр-) возбудителей были следующие: раневое отделяемое (Гр+/Гр- 18/31), из которых продуценты БЛРС=15, Carb=15; отделяемое из дренажа (Гр+/Гр- 3/8) из них продуценты БЛРС=6, Carb=3; содержимое абсцесса (Гр+/Гр- 2/4) из них БЛРС=2, Carb=0; кровь (Гр+/Гр- 4/2), БЛРС=0, Carb=1; БАЛ (Гр+/Гр- 2/8) БЛРС=3, Carb=3; содержимое плевральной полости (Гр+/Гр- 2/0) (табл. 3).

Таким образом, обращает на себя внимание достаточно высокий процент продуцентов БЛРС и Carb — $n=45$; 54,7% от общего количества положительных посевов ($n=84$).

Показатели рациональности схем периоперационной профилактики. Рациональность проведения ПАП оценивали по анализу схем периоперационной профилактики и структуры назначения АБП, который показал, что назначения соответствовали рекомендациям в 207(35,9%) случаев. В 274 (47,6%) случаях отмечен нерациональный выбор АБП для ПАП, без учёта типа операционных ран и особенностей оперативного вмешательства. Среди схем для проведения ПАП, можно выделить высокую частоту назначения ЦФ (цефалоспоринов) 3-го поколения, ротацию ЦФ 1-, 2-, 3-го поколений в течение периоперационного периода, а также назначение карбапенемов и ингибиторозащищённых аминопенициллинов (ИЗАП) в комбинациях с аминогликозидами (амикацин), метронидазолом и фторхинолонами (ципрофлоксацин) пациентам с чистыми и условно-чистыми ранами. В исследуемой когорте общая частота нарушения сроков проведения

Таблица 4. Структура схем АБП для периоперационной профилактики инфекционных осложнений области хирургического вмешательства

Схема периоперационной профилактики ИОХВ	Количество схем, <i>n</i>	Нарушение режима дозирования, <i>n</i>
Рациональные схемы	207	64
Цефалоспорины I—II	93	29
Цефалоспорины I + метронидазол	27	24
ИЗАП	87	11
Нерациональные схемы	274	161
Цефалоспорины III—IV	141	68
Цефалоспорины III—IV в комбинациях с метронидазолом	79	56
Ротация цефалоспоринов I—II—III	39	23
Ротация цефалоспоринов с ванкомицином	11	8
Карбапенемы	7	2
ИЗАП в комбинациях с аминогликозидами, фторхинолонами	4	4

Таблица 5. Длительность проведения периоперационной профилактики инфекционных осложнений области хирургического вмешательства

Сроки проведения периоперационной профилактики ИОХВ	Число больных	
	абс.	%
Однократное введение АБП до операции	117	20,3
Проведение ПАП в течение 24 ч	116	20,1
Приём АБП в течение 48 ч	89	15,5
Более 3—4 сут.	127	22
Более 5—7 сут.	80	13,9
Более 8—10 сут.	32	5,6
От 10 до 14 сут.	15	2,6

Таблица 6. Частота развития нежелательных побочных реакций в зависимости от длительности периоперационной профилактики инфекционных осложнений области хирургического вмешательства

Длительность периоперационной профилактики ИОХВ	НПР	
	абс.	%
Однократное введение АБП до операции	0	—
Проведение ПАП в течение 24 ч	0	—
Приём АБП в течение 48 ч	5	21,7
Более 3—4 сут.	3	13
Более 5—7 сут.	3	13
Более 8—10 сут.	5	21,7
От 10 до 14 сут.	7	30,4
Всего	23	100

ПАП отмечена в 459 (79,8%) случаях. Общее число случаев нарушения режимов дозирования составило — 225 (39,1%).

Назначение рациональных схем ПАП ($n=207$; 35,9%) сочеталось с нарушением сроков проведения ПАП в 179 (37,1%) случаях, сопровождавшееся нарушениями режимов дозирования у 64 (28,4%) пациента (табл. 4).

Нерациональный выбор АБП (274; 47,6%) в 289 случаях (62,9%) сопровождался нарушением длительности ПАП (продление более 24—48 ч), с тенденцией к назначению субтерапевтических доз в 161 (71,5%) случаях (табл. 5).

Анализ безопасности антибактериальных препаратов для проведения периоперационной профилактики. Ретроспективный анализ медицинской документации показал, что общее количество НПР составило 23 случая (3,9%). Все случаи нежелательных реакций были отмечены в группе пациентов, которым в послеоперационном периоде проводили ПАП более 48 ч (табл. 6). Таким образом, было отмечено, что риск развития

НПР увеличивается по мере увеличения длительности ПАП.

По данным активного мониторинга были выявлены следующие НПР: антибиотик-ассоциированный колит — 9 (33,3%), психомоторное возбуждение — 6 (22,2%), псевдоаллергические реакции — 3 (13%), повышение трансаминаз — 3 (13%), антибиотик-ассоциированная нефропатия (ванкомицин) — 2 (8,6%), удлинение интервала QT-2 — (8,6%).

Последующий корреляционный анализ выявил положительные связи между развитием НПР и возрастом ($r=0,109$; $p=0,009$), длительностью госпитализации ($r=0,291$; $p<0,0001$), длительностью пребывания в ОРИТ ($r=0,374$; $p<0,0001$), летальным исходом ($r=0,269$; $p<0,0001$), уровнем послеоперационных осложнений неинфекционного генеза ($r=0,340$; $p<0,0001$), уровнем креатинина и клиренсом креатина в послеоперационном периоде ($r=0,256$; $p<0,0001$). Отсутствовали корреляционные связи между НПР и наличием аллергоанамнеза ($r=0,039$; $p=0,348$), рациональностью выбора

Таблица 7. Достоверность распределения в группе пациентов с нежелательными побочными реакциями и анализируемыми параметрами (возрастом, аллергоанамнезом, длительностью госпитализации, ОРИТ, ИВЛ, послеоперационными осложнениями, клиренсом креатинина и летальным исходом)

Параметр	Нежелательные побочные реакции	
	p_1 U-тест Манна–Уитни	p_2 Колмогорова–Смирнова
Возраст	0,025	0,315
Аллергоанамнез	$p=0,308$	$p>1$
Длительность ИВЛ	$<0,0001$	0,017
Длительность ОРИТ	$<0,0001$	$<0,0001$
Длительность госпитализации	$<0,0001$	$<0,0001$
Летальный исход	$<0,0001$	0,121
Послеоперационные осложнения неинфекционного генеза	$<0,0001$	$<0,0001$
Уровень креатинина и КК в послеоперационном периоде	$<0,0001$	$<0,0001$
Инфекционные осложнения	$p=0,165$	$p>1$

Таблица 8. Факторы, влияющие на частоту инфекционных осложнений, длительность ОРИТ, длительность госпитализации, частоту повторных оперативных вмешательств, рост полирезистентной флоры и летальный исход (метод U-test Mann–Whitney)

Варианты нерациональных схем ПАП	Инфекционные осложнения p^*	Длительность пребывания в ОРИТ p^*	Длительность госпитализации p^*	Повторные операции, ассоциированные с инфекцией p^*	Наличие полирезистентной флоры в посевах p^*	Летальный исход p^*
Нерациональные схемы ПАП	0,900	0,116	0,206	0,103	0,610	0,002
Превышение длительности ПАП	>1	0,003	0,53	0,934	0,290	0,465
Нарушения режима дозирования	0,603	$<0,005$	0,5	0,001	0,016	0,980
Повышения креатинина через 24 ч после оперативного вмешательства	0,006	0,049	0,001	0,567	0,899	0,003

Примечание. * – U-test Манна–Уитни.

схем ПАП ($r=0,340$; $p=0,387$), адекватностью режимов дозирования АБП ($r=0,028$; $p=0,504$), длительностью ПАП ($r=0,017$; $p=0,687$) и инфекционными осложнениями ($r=0,032$; $p=0,443$).

Для проверки гипотезы связи НПП с анализируемыми показателями использовали U-тест Манна–Уитни и критерий Колмогорова–Смирнова. Результаты представлены в табл. 7.

Для летального исхода критерий Колмогорова–Смирнова не достигает достоверных значений — $p=0,121$ (см. табл. 7). Также стоит отметить, что снижение клиренса креатинина в послеоперационном периоде являлся достоверным предиктором развития НПП на фоне применения АБП.

Взаимосвязи различных схем периоперационной профилактики с частотой инфекционных осложнений, длительностью госпитализации и пребывания в отделении интенсивной терапии, ростом полирезистентной флоры, развитием нежелательных побочных реакций. В ходе исследования был проведён дополнительный статистический анализ, позволяющий оценить наличие взаимосвязей различных факторов, таких как нерациональные схемы ПАП, клинико-демографические особенности пациентов (возраст, пол, ИМТ, основное заболевание, функциональное состояние почек, характер оперативного вмешательства, тип ран, объём кровопотери) и частотой инфекционных осложнений, потребностью в по-

вторных оперативных вмешательствах, длительностью госпитализации, длительностью пребывания в ОРИТ, ростом полирезистентной флоры, уровнем летальности (табл. 8).

Высокая степень статистической значимости выявлена в отношении взаимосвязи нерациональных схем ПАП с уровнем летальности ($p=0,002$), нерациональной длительности ПАП и нарушений режимов дозирования — с длительностью пребывания в ОРИТ ($p=0,003$ и $p<0,005$, соответственно). Нарушения режима дозирования также повышают риск проведения повторных вмешательств, ассоциированных с инфекцией ($p=0,001$).

Важным является также тот факт, что повышенный уровень креатинина через 24 ч после оперативного вмешательства, как маркер функционального состояния почек, имеет достоверные взаимосвязи с частотой инфекционных осложнений ($p=0,006$), длительностью пребывания в ОРИТ ($p=0,049$), длительностью госпитализации ($p=0,001$) и уровнем летальности ($p=0,003$).

Рациональное проведение ПАП — один из основных инструментов регулирования внутрибольничной инфекции у пациентов хирургического профиля. Проведение ПАП преследует цель снизить уровень послеоперационных осложнений, длительность пребывания в ОРИТ, в стационаре, показатели летальности от гнойно-септических осложнений. Проблема изучения привер-

женности рекомендациям по проведению рациональной ПАП требует активного участия специалистов различного профиля: хирургов, анестезиологов, клинических фармакологов, эпидемиологов и администрации [16].

Результаты исследования свидетельствуют, что проводимая ПАП, соответствует международным и национальным рекомендациям в 52,4%. Достаточно высокий уровень несоответствия режимов ПАП (47,6%) характеризуется нерациональным выбором антибактериального препарата, необоснованной длительностью (85,4%) и нарушением режимов дозирования (66,4%).

Необходимо отметить, что наши данные во многом согласуются с данными исследований А. Khan [17], G. Vessal [18] и E. Mohamed [19] о недостаточной приверженности рекомендациям по проведению ПАП у пациентов хирургического профиля, при этом разброс приверженности рекомендациям варьирует — от 1,7 до 82%. В большинстве этих исследований авторы делали акцент на изучение приверженности рекомендациям по времени назначения ПАП до операции.

По данным обзора М. Gouvêa и др., показатель приверженности схемам ПАП в изученных исследованиях составил 70,3–95%, рациональное назначение ПАП — в 22–95%, нерациональное использование — в 2,3–100%, нарушение сроков ведения АБП до операции — 73–100%, общее соблюдение сроков ПАП — 5,8–91,4% [20].

В ходе ретроспективного исследования Prospero E. и др., авторы изучили приверженность рекомендациям за 6-летний период, которая составила 58%, при этом на частоту инфекционных осложнений в послеоперационном периоде наибольшее влияние оказывали длительность операции (OR 1,68, 95% CI 1,56–1,82) и срочное оперативное вмешательство (OR 2,16, 95% CI 1,96–2,37). Так же авторы отметили, что несмотря на достаточно низкую приверженность рекомендациям по ПАП, в группе, где соблюдались протоколы проведения ПАП, наблюдалось снижение частоты инфекционных осложнений [21].

С целью преодоления низкой приверженности эксперты ВОЗ рекомендуют использование чек-листа для периоперационного ведения больных, в том числе для соблюдения режима проведения ПАП, что должно способствовать улучшению междисциплинарной комплаентности при проведении ПАП [22].

Кроме изучения комплаентности рекомендациям ПАП, особое внимание ряд исследователей уделял изучению структуры назначения АБП для проведения ПАП. По нашим данным, отмечен высокий уровень назначения ЦФ III поколения, в т.ч. с антисинегнойной активностью. Результаты международных исследований E. Lautenbach и др. [23], J. Rodríguez-Vaño и др. [24] демонстрируют

высокий уровень корреляции между применением ЦФ III поколения и распространением штаммов продуцентов БЛРС. Результаты нашего микробиологического мониторинга ($n=84$) косвенно свидетельствуют о высоком уровне выделения штаммов БЛРС+ (22; 26,2%). Появление штаммов, обладающих устойчивостью к карбапенемам Carb+ (23; 27,3%), также является тревожным фактом, поскольку при развитии инфекционных осложнений, ассоциированных с такими госпитальными штаммами, спектр выбора АБП резко ограничен.

Полученные нами данные о безопасности назначения АБП (НПР=23; 3,9%) свидетельствуют о достаточно высокой частоте антибиотик-ассоциированного колита на фоне применения ЦФ (9; 1,6%) и эпизодов психомоторного возбуждения у больных пожилого возраста на фоне назначения ципрофлоксацина в комбинациях с метронидазолом (6; 1,04%). По данным эпидемиологических исследований антибиотико-ассоциированная диарея развивалась у 8% госпитализированных больных, из которых в 1–3% случаев было отмечено фульминантное течение. Авторы исследования пришли к выводу, что кроме АБП, факторами риска могут быть антихолинергические препараты и препараты замедляющие перистальтику кишечника [25].

По данным обзора М. F. Grill, распространенность неврологических нарушений на фоне назначения пациентам хирургического профиля фторхинолонов в комбинациях достаточно высока. При этом спектр нарушений включает не только эпизоды психомоторного возбуждения, но и эпизоды судорог, миоклонус, делирий, дизартрию, атаксию. Наиболее часто тяжёлые неврологические реакции были отмечены в группе пожилых пациентов и у пациентов с отягощённым неврологическим анамнезом. Автор отмечает, что неврологические побочные реакции возникают с одинаковой частотой на фоне применения любых фторхинолонов [26].

Увеличение риска развития НПР на фоне длительной избыточной ПАП является весомым аргументом в пользу следования существующим рекомендациям. Данные корреляционного анализа нашего исследования свидетельствуют о связи НПР с такими показателями, как длительность госпитализации ($r=0,291$, $p<0,0001$), длительность ОРИТ ($r=0,374$; $p<0,0001$), уровень летальности ($r=0,269$; $p<0,0001$), длительность ИВЛ ($r=0,249$; $p<0,0001$).

Особое внимание обращает факт взаимосвязи уровня креатинина и клиренса креатинина ($p<0,0001$), как маркера нарушения функции почек, на частоту развития НПР на фоне назначения АБП. Ряд исследований демонстрирует, что снижение функции почек ведёт к изменению параметров фармакокинетики АБП, в ряде случаев увеличивает риск развития НПР, в том числе

жизнеугрожающих. Данные результаты требуют проведения дополнительных проспективных исследований [27, 28].

Заключение

Таким образом, в реальной клинической практике сохраняется низкий уровень приверженности рекомендациям по проведению периоперационной профилактики.

Использование нерациональных комбинаций имеет взаимосвязь с уровнем летальности ($p=0,002$), нерациональная длительность ПАП — с длительностью пребывания в ОРИТ ($p=0,003$), нарушения режима дозирования АБП — с частотой повторных оперативных вмешательств, ассоциированных с инфекцией ($p=0,001$) и длительностью пребывания в ОРИТ ($p=0,005$).

НПР достоверно являются факторами риска увеличения длительности ИВЛ ($p<0,0001$), дли-

тельности пребывания в ОРИТ ($p<0,0001$), длительности госпитализации ($p<0,0001$).

С учётом выявленного достоверного влияния уровня креатинина на риск развития инфекционных осложнений ($p=0,003$) и уровень летальности ($p=0,003$) можно предполагать высокую прогностическую значимость функции почек, что требует проведения дополнительных проспективных клинических исследований в данной когорте пациентов.

Выражение признательности

Бабенко Олегу Васильевичу, главному врачу УКБ 1 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова;

Ногтеву Павлу Владимировичу, заведующему отделением реанимации УКБ 1 Первого МГМУ им. И. М. Сеченова;

Морозовой Ольге Алексеевне, заведующей межклинической бактериологической лабораторией Первого МГМУ им. И. М. Сеченова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yoshiaki Gu., Mitsuo K. How can we fight against antimicrobial-resistant bacteria in the World Health Organization Western Pacific Region? Western Pac Surveill Response J. Jul-Sep 2012; 3 (3): 40–42
2. Spellberg B., Gilbert D.N. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. Clin Infect Dis J. 2014; 59 (suppl 2): S71–S75.
3. Michael C.A., Dominey-Howes D., Labbate M. The antibiotic resistance crisis: causes, consequences, and management. Front Public Health J. 2014; 2: 145
4. Яковлев С.В., Суворова М.П., Белобородов В.Б., Басин Е.Е., Елисеева Е.В., Ковеленов С.В., и члены исследовательской группы ЭРГИНИ. Распространенность и клиническое значение нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях России: исследование ЭРГИНИ. Антибиотики и химиотерапия 2016; 61 (5–6): 32–42. / Yakovlev S.V., Suvorova M.P., Beloborodov V.B., Basin E.E., Eliseeva E.V., Kovelonov S.V., i chleny issledovatel'skoy gruppy ERGINI. Rasprostranennost' i klinicheskoe znachenie nozokomial'nykh infektsiy v lechebnykh uchrezhdeniyakh Rossii: issledovanie ERGINI. Antibiotiki i khimioter 2016; 61 (5–6): 32–42. [in Russian]
5. Kevin B. Laupland A., Deirdre L., Church B. Population-Based Epidemiology and Microbiology of Community-Onset Bloodstream Infections. ClinMicrobiol Rev. Oct 2014; 27 (4): 647–664. doi: 10.1128/CMR.00002-14
6. Malhotra-Kumar S., Lammens C., Coenen S., Van Herck K., Goossens H. Effect of azithromycin and clarithromycin therapy on pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. Lancet 2007; 369 (9560): 482–490.
7. Harbarth S., Samore M.H., Lichtenberg D., Carmeli Y. Prolonged antibiotic prophylaxis after cardiovascular surgery and its effect on surgical site infections and antimicrobial resistance. Circulation 2000; 101 (25): 2916–2918.
8. Kachroo S., Dao T., Zabaneh F., Reiter M., Larocco M.T., Gentry L.O. et al. Tolerance of vancomycin for surgical prophylaxis in patients undergoing cardiac surgery and incidence of vancomycin-resistant enterococcus colonization. Annals of Pharmacotherapy 2006; 40 (3): 381–382.
9. Яковлев С.В., Журавлева М.В., Проценко Д.Н., Белобородов В.Б., Брик Н.И., Брусица Е.Б., и др. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи. Методические рекомендации для лечебно-профилактических учреждений Москвы. Consilium Medicum. 2017; 19 (7.1. Хирургия): 15–51. / Yakovlev S.V., Zhuravleva M.V., Protsenko D.N., Beloborodov V.B., Briko N.I., Brusina E.B., i dr. Programma SKAT (Strategiya Kontrolya Antimikrobnoy Terapii) pri okazanii statsionarnoy meditsinskoй pomoshchi. Metodicheskie rekomendatsii dlya lechebno-profilakticheskikh uchrezhdeniy Moskvy. Consilium Medicum 2017; 19 (7.1. Khirurgiya): 15–51. [in Russian]
10. Распоряжение Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р О Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г. <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71677266/#ixzz511Wp6RdF> / Rasporiyazhenie Pravitel'stva RF ot 25 sentyabrya 2017 g. № 2045-р О Strategii preduprezhdeniya rasprostraneniya antimikrobnoy rezistentnosti v RF na period do 2030 g. <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71677266/#ixzz511Wp6RdF> [in Russian]
11. Асланов Б.И., Зуева Л.П., Колосовская Е.Н., Любимова А.В., Хорошилов В.Ю., Долгий А.А., и др. Принципы организации периоперационной антибиотикопрофилактики в учреждениях здравоохранения. М.: 2014. — XX с. / Aslanov B.I., Zueva L.P., Kolosovskaya E.N., Lyubimova A.V., Khoroshilov V.YU., Dolgiy A.A., i dr. Printsipy organizatsii perioperatsionnoy antibiotikoprofilaktiki v uchrezhdeniyakh zdavookhraneniya. Moskva, 2014; XX. [in Russian]
12. Козлов П.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2000. — Т. 2. — №3. — С. 16–22. / Kozlov P.S. Nozokomial'nye infektsii: epidemiologiya, patogenezi, profilaktika, kontrol'. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya 2000; 2: 3: [in Russian]
13. Bratzler D. W., Dellinger E. P., Olsen K. M., Perl T. M., Auwaerter P. G. et al. Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. Am J Health-Syst Pharm. 2013; 70: 195–283.
14. Козлов П.С., Дехнич А.В. Справочник по антимикробной терапии / Смоленск: МАКМАХ, 2010 г. — 416 с (224 с). / Kozlov P.S., Dekhnich A.V. Spravochnik po antimikrobnoy terapii/ Smolensk: MAKMAKH, 2010; 416 (224). [in Russian]
15. American Society of Health-System Pharmacists. ASHP therapeutic guidelines on antimicrobial prophylaxis in surgery. Am J Health-Syst Pharm 1999; 56: 1839–1888.
16. Sinha B., Assen S., Friedrich A. W. Important issues for perioperative systemic antimicrobial prophylaxis in surgery. CurrentOpinion. 2014; 27 (4): 377–381.
17. Afzan Khan A. K., Mirshad P. V., Rashed M.R., Banu G. A study on the usage pattern of antimicrobial agents for the prevention of surgical site infections (SSIs) in a tertiary care teaching hospital. J Clin Diagn Res. 2013; 7(4): 671–674.
18. Vessal G., Namazi S., Davarpanah M.A., Foroughinia F. Evaluation of prophylactic antibiotic administration at the surgical ward of a major referral hospital, Islamic Republic of Iran. East Mediter Health J. 2011; 17 (8): 663–668.
19. Mohamed E. H., Asim A. E., Farah H.F., Abdulla S., Naama M. A., Sahar A. S. O., Rauda A. Clinicalpharmacists' review of surgical antimicrobial prophylaxis in atertiary hospital in Abu Dhabi. Int J Clin Pharm (2015) 37: 18–22.
20. Gouvea M., Novaes CdeO., Pereira D. M., Iglesias A. C. Adherence to guidelines for surgical antibiotic prophylaxis: areview. Braz J Infect Dis. 2015 Sep-Oct; 19 (5): 517–524. doi: 10.1016/j.bjid.2015.06.004.
21. Prospero E., Barbadoro P., Marigliano A., Martini E., D'Errico M. Perioperative antibiotic prophylaxis: improved compliance and impact on infection rates. Epidemiol Infect. 2011 Sep; 139 (9): 1326–1331. doi: 10.1017/S0950268810002505. Epub 2010 Nov 19.
22. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Printed by the WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44186/7/9789244598597_rus.pdf
23. Lautenbach E., Patel J.B., Bilker W.B. et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *E.coli* and *K.pneumoniae*: risk factors for infec-

- tion and impact of resistance on outcomes. Clin Infect Dis 2001; 32: 1162—1171.
24. *Rodríguez-Baño J., Picón E., Gijón P. et al.* Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2010; 48: 1726—1731.
 25. *Greenstein A.J., Byrn J.C., Zhang L.P., Swedish K.A., Jahn A.E., Divino C.M.* Risk factors for the development of fulminant *Clostridium difficile* colitis. Surgery. 2008 May; 143 (5): 623—629.
 26. *Grill M. F., Maganti R. K.* Neurotoxic effects associated with antibiotic use management considerations. Br J Clin Pharmacol. 2011 Sep; 72 (3): 381—93. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03991.x.
 27. *Harris D.G., McCrone M.P., Koo G., Weltz A.S., Chiu W.C., Scalea T.M., Diaz J.J., Lissauer M.E.* Epidemiology and outcomes of acute kidney injury in critically ill surgical patients. J Crit Care. 2015 Feb; 30 (1): 102—6. doi: 10.1016/j.jcrc.2014.07.028.
 28. *Blot S., Lipman J., Roberts D.M., Roberts J.A.* The influence of acute kidney injury on antimicrobial dosing in critically ill patients: are dose reductions always necessary. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 May; 79 (1): 77—84. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.015.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Морозова Татьяна Евгеньевна — профессор, д.м.н., Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва

Лукина Мария Владимировна — ассистент, Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва

Андрущишина Татьяна Борисовна — к. м. н., доцент, Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва

Чукина Мария Александровна — аспирант, Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва

Особенности антимикробной терапии инфекционного эндокардита в Российской Федерации

А. И. ДАНИЛОВ*, Р. С. КОЗЛОВ, С. Н. КОЗЛОВ, А. В. ДЕХНИЧ, Л. П. ЖАРКОВА

Смоленский государственный медицинский университет МЗ РФ, Смоленск

Features of Antimicrobial Therapy of Infective Endocarditis in the Russian Federation

A. I. DANILOV*, R. S. KOZLOV, S. N. KOZLOV, A. V. DEKHNICH, L. P. ZHARKOVA

Smolensk State Medical University, Smolensk

В статье представлены результаты многоцентрового исследования этиологии, антибиотикочувствительности и фармакоэпидемиологии инфекционного эндокардита. Цель настоящего исследования — проанализировать сложившуюся практику назначения антимикробной терапии пациентам с инфекционным эндокардитом в Российской Федерации. В исследование включались пациенты обоего пола всех возрастных групп с определённым и вероятным инфекционным эндокардитом. Проанализировано 406 (в ретроспективной — 240, в проспективной части — 166) случаев инфекционного эндокардита. При стартовой антимикробной терапии наиболее часто назначались аминогликозиды и парентеральные цефалоспорины III поколения, реже — гликопептиды, фторхинолоны, аминопенициллины и антистафилококковые пенициллины. При смене антимикробной терапии преобладало назначение гликопептидов, аминогликозидов, фторхинолонов и парентеральных цефалоспоринов III поколения.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит, этиологическая структура, антимикробная терапия.

The article presents the results of a multicenter study of the etiology, antibiotic sensitivity, and pharmacoepidemiology of infective endocarditis. The purpose of this study is to analyze the current practice of prescribing antimicrobial therapy to patients with infective endocarditis in the Russian Federation. The study included patients of both sexes of all age groups with definite and possible infectious endocarditis. 406 cases of infective endocarditis were analyzed (240 in the retrospective part of the study and 166 in the prospective part). Aminoglycosides and parenteral cephalosporins of the third generation were most frequently prescribed at the beginning of antimicrobial therapy; glycopeptides, fluoroquinolones, aminopenicillins, and antistaphylococcal penicillins were prescribed less often. Glycopeptide, aminoglycoside, fluoroquinolone, and parenteral III generation cephalosporins prevailed after the change of antimicrobial therapy.

Keywords: infective endocarditis, etiological structure, antimicrobial therapy.

Введение

Заболеваемость инфекционным эндокардитом (ИЭ) составляет 3—10 случаев на 100 тыс. человек в год. Несмотря на внедрение современных методов диагностики, установленных алгоритмов проведения бактериологического исследования крови, использование схем рациональной антимикробной терапии (АМТ), летальность при ИЭ остаётся высокой, составляя более 20% [1, 2].

В течение последних десятилетий увеличилось количество и изменилось соотношение основных факторов риска данной нозологии. Наиболее важную роль стали играть инъекционная наркомания, кардиохирургические операции и инвазивные медицинские манипуляции [3].

В этиологической структуре ИЭ ведущую роль традиционно играют грамположительные микроорганизмы, среди которых наиболее часто выделяют *Staphylococcus aureus*, *S. viridans*, коагулазонегативный стафилококк и *Enterococcus* spp. [2, 4].

В последние годы отмечается рост резистентности большинства возбудителей ИЭ к антимикробным препаратам (АМП), применяемым в клинической практике. В случае ИЭ основную проблему представляют метициллинорезистентные штаммы *S. aureus* (MRSA) и штаммы *Enterococcus* spp. с высоким уровнем резистентности к аминогликозидам [5, 6].

Своевременная диагностика и последующее назначение АМТ способствуют кардинальному снижению рисков развития анатомических изменений клапанного аппарата сердца при ИЭ. Вместе с тем, в большинстве случаев адекватное назначение АМТ при данной патологии происходит

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: e-mail: dr.DanAndr@yandex.ru

Характеристика включенных в исследование случаев ИЭ

Характеристики	Январь 2006 г. — август 2011 г.	Сентябрь 2011 г. — декабрь 2016 г.	Весь период
Возраст, $M \pm m$	42,5 $\pm$ 15,4	45,0 $\pm$ 16,7	43,5 $\pm$ 16,0
Пол			
Мужчины	155/240 (64,6%)	124/166 (74,7%)	279/406 (68,7%)
Женщины	85/240 (35,4%)	42/166 (25,3%)	127/406 (31,3%)
Локализация поражения			
Митральный клапан	103/240 (42,9%)	74/166 (44,6%)	177/406 (43,6%)
Аортальный клапан	88/240 (36,7%)	66/166 (39,8%)	154/406 (37,9%)
Трикуспидальный клапан	84/240 (35,0%)	57/166 (34,3%)	141/406 (34,7%)
Клапан легочной артерии	1/240 (0,4%)	1/166 (0,6%)	2/406 (0,5%)
Тип клапана			
Нативный клапан	217/240 (90,4%)	138/166 (83,1%)	355/406 (87,4%)
Протезированный клапан	23/240 (9,6%)	28/166 (16,9%)	51/406 (12,6%)

только в условиях оказания специализированной медицинской помощи [2].

Высокие цифры летальности при ИЭ во многом обусловлены развитием осложнений, среди которых наиболее часто отмечаются развитие и прогрессирование сердечной недостаточности, тромбоэмболические проявления, формирование инфекционных аневризм, а также поражение внутренних органов различной локализации [2, 3].

Учитывая вышеизложенное, в настоящей работе была поставлена цель — проанализировать сложившуюся практику назначения АМТ у пациентов с ИЭ в Российской Федерации.

Материал и методы

Проведено многоцентровое исследование этиологии, антибиотикорезистентности и фармакоэпидемиологии ИЭ, состоящее из 2 частей: ретроспективной (январь 2006 г. — август 2011 г.) и проспективной (сентябрь 2011 г. — декабрь 2016 г.).

В исследование включались пациенты обоего пола всех возрастных групп с определённым и вероятным ИЭ (таблица). Диагноз ИЭ выставлялся согласно критериям Duke [7, 8]. Критериями включения в исследование были: наличие диагноза определённого или вероятного ИЭ в медицинской карте стационарного больного, факт взятия хотя бы одного образца крови для бактериологического исследования, проведённая эхокардиография, доступность медицинской документации для заполнения индивидуальной регистрационной карты пациента.

Всего в исследование было включено 406 (в ретроспективной части — 240, в проспективной части — 166) пациентов с ИЭ, средний возраст которых составил 43,5 $\pm$ 16,0 лет. В структуре пациентов преобладали лица мужского пола.

Пациенты находились на стационарном лечении в 11 лечебных учреждениях 9 городов Российской Федерации (Смоленск, Москва, Архангельск, Казань, Омск, Тюмень, Якутск, Санкт-Петербург, Ярославль, Иркутск).

Эффективность назначенных препаратов оценивалась в соответствии с записями в медицинской карте стационарного больного на основании улучшения общего состояния пациента, исчезновения симптомов интоксикации, положительной динамики при проведении бактериологического исследования крови и эхокардиографии.

В ходе исследования учитывались анамнестические и клинические данные каждого пациента, которые вносились в специально разработанные индивидуальные регистрационные карты и вводились с использованием метода двойного ввода в специализированную базу данных, разработанную на основе базы управления данными Microsoft Access для Windows. Статистическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета SAS Institute, США, версия 8.02 для Windows XP.



Рис. 1. Выбор АМП в общей структуре исследования при терапии до настоящей госпитализации, %.

Результаты исследования

В общей структуре исследования в 80 (20,2%) случаях пациенты получали АМТ до настоящей госпитализации, среди которых наиболее часто назначались парентеральные цефалоспорины III поколения (28,9%), фторхинолоны (16,0%) и гликопептиды (10,9%), (рис. 1).

В качестве стартовой терапии в общей структуре исследования комбинированная АМТ использовалась только в 40,7%, монотерапия — в 59,3% случаев. При этом наиболее часто назначались аминогликозиды (22,8%), парентеральные цефалоспорины III поколения (22,1%) и гликопептиды (14,5%). Реже назначались фторхинолоны (6,7%), аминопенициллины (6,6%), антистафилококковые пенициллины (6,4%), ингибиторозащищённые аминопенициллины (4,1%) и парентеральные цефалоспорины I поколения

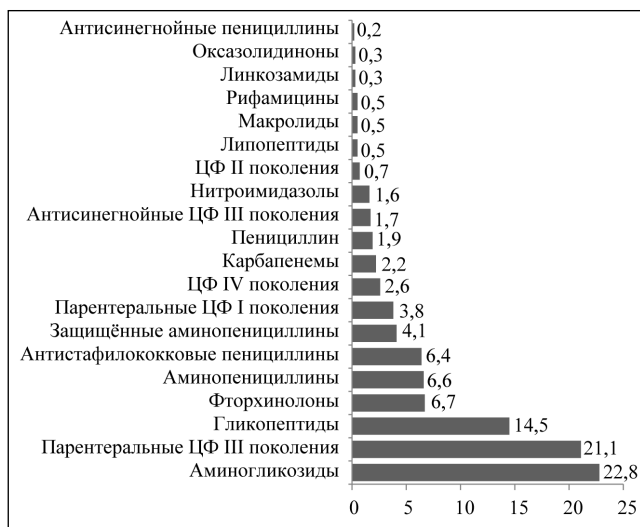


Рис. 2. Выбор АМП при стартовой терапии ИЭ, %.



Рис. 3. Схемы АМТ, назначаемые в более 1%, при стартовой монотерапии в общей структуре исследования, %.

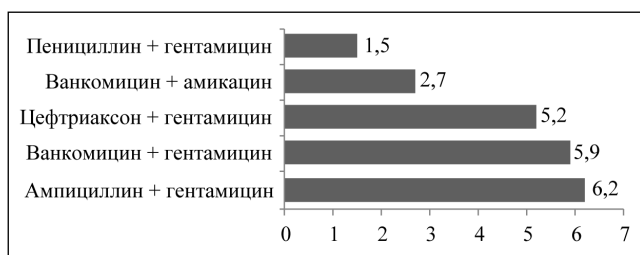


Рис. 4. Схемы АМТ, назначаемые в более 1%, при стартовой комбинированной терапии в общей структуре исследования, %.

(3,8%). Другие АМП назначались в единичных случаях (рис. 2).

Среди схем стартовой АМТ в качестве монотерапии наиболее часто назначались цефтриаксон и ванкомицин — 17,0 и 7,2%, соответственно,

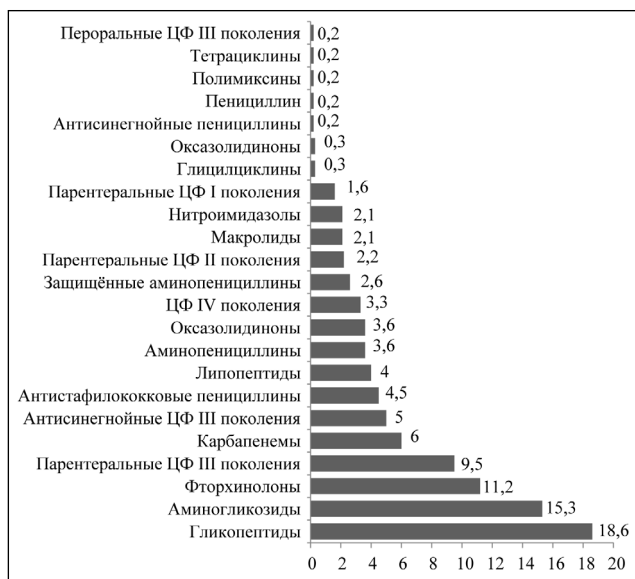


Рис. 5. Выбор АМП при смене терапии ИЭ, %.

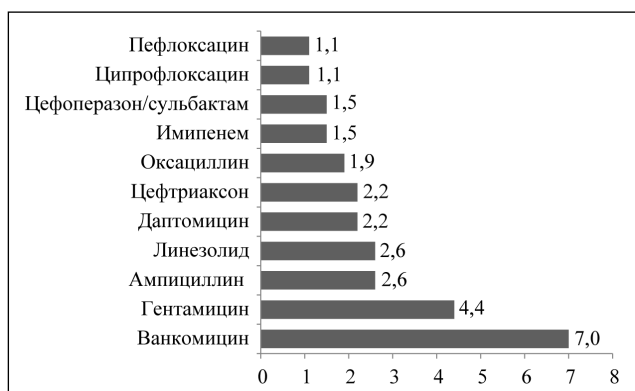


Рис. 6. Схемы АМТ, назначенные в более 1%, при смене монотерапии в общей структуре исследования, %.

(рис. 3). При комбинированной терапии чаще других назначались комбинации ампициллина или ванкомицина в сочетании с гентамицином — 6,2 и 5,9%, соответственно (рис. 4).

Эффективность стартовой АМТ в общей структуре исследования имела следующие градации: выздоровление — 6,4%, улучшение — 44,9%, отсутствие эффекта — 45,2%, ухудшение — 0,7%, летальный исход — 2,7%.

В 66,9% случаев стартовая АМТ была изменена. При этом наиболее часто назначались гликопептиды (18,6%), аминогликозиды (15,3%), фторхинолоны (11,2%) и парентеральные цефалоспорины III поколения (9,5%), (рис. 5).

При смене АМТ в общей структуре исследования в качестве монотерапии наиболее часто назначались ванкомицин — 7,0% и гентамицин — 4,4% (рис. 6). При комбинированной терапии чаще других назначались комбинации ванкомицина



Рис. 7. Схемы АМТ, назначенные в более 1%, при смене комбинированной терапии в общей структуре исследования, %.

с аминогликозидами (гентамицин и амикацин — 2,2%), (рис. 7).

Эффективность АМТ в данной ситуации несколько улучшилась. В большинстве случаев отмечались улучшение — в 75,3% и выздоровление — в 10,3%. Отсутствие эффекта было зафиксировано в 3,3%, летальный исход — в 11,1%.

Обсуждение результатов

Возбудителями ИЭ потенциально могут быть многие микроорганизмы, большинство которых являются грамположительными [2, 3]. Вместе с тем, за последние десятилетия в этиологической структуре ИЭ произошли существенные изменения, в частности ведущим возбудителем вместо группы *S. viridans* стал *S. aureus*. В связи с этим, следует отметить необоснованность высокой частоты назначения цефалоспоринов III поколения, не проявляющих должной активности в отношении стафилококков, без предшествующего выделения возбудителя.

Несмотря на отсутствие на сегодняшний день чётких доказательств преимущества комбинированной терапии ИЭ над монотерапией, в ряде случаев комбинированный характер терапии имеет принципиально важное значение. Согласно данным ряда источников литературы, комбинированная АМТ способствует профилактике рецидивов и снижению длительности терапии, в особенности в случае энтерококковой этиологии [9]. Согласно результатам проведённого исследования, в ходе стартовой АМТ доля комбинированной терапии составила 40,7%.

Наиболее частыми комбинациями АМП при терапии пациентов с ИЭ являются сочетания β -лактамов и гликопептидов с аминогликозидами [10]. Это подтвердило и настоящее исследование, согласно которому самыми частыми комбинациями среди всех схем при стартовой АМТ были сочетания ампициллина или ванкомицина с гентамицином, 6,2 и 5,9%, соответственно.

Следует отметить, что согласно существующим рекомендациям при назначении аминогликозидов у пациентов с ИЭ предпочтение следует отдавать стрептомицину или гентамицину [11]. В связи с чем, назначение амикацина, не обладающего необходимой при терапии ИЭ активностью в отношении грамположительных кокков, в ходе стартовой АМТ (2,7%) и при её смене (2,2%) следует признать некорректным.

В условиях того, что пациенты с ИЭ имеют потенциально полиорганную недостаточность, в том числе почечную недостаточность, одновременное назначение гликопептидов и аминогликозидов в течение длительного времени существенно повышает риски развития и прогрессирования нефропатии. Подтверждением этому служит тот факт, что в последнее время появляется всё больше работ, в которых доказываются эффективность и снижение риска возникновения нежелательных реакций при применении потенциально более безопасных сочетаний, в частности комбинации ампициллина с цефтриаксоном в отношении *Enterococcus faecalis* [10, 11].

С учётом увеличения частоты развития бактериемии, вызванной MRSA, проведено достаточно большое количество исследований, затрагивающих вопрос сравнения стандартной схемы (ванкомицин + гентамицин) и даптомицина. Согласно результатам подавляющего количества этих исследований, даптомицин не уступает стандартной схеме и его назначение при бактериемии, вызванной MRSA, является оправданным. Дополнительными его преимуществами являются более быстрый бактерицидный эффект по сравнению с ванкомицином и отсутствие потенциальной нефротоксичности [11]. При стартовой АМТ в ходе настоящего исследования даптомицин назначался в 0,5%, при смене АМТ — в 4,0%. Низкую частоту назначения данного препарата в Российской Федерации можно объяснить его высокой стоимостью.

Одним из АМП, активным в отношении полирезистентных грамположительных микроорганизмов, является линезолид. При стартовой АМТ он был назначен в 0,3%, при её смене — в 3,6%. Вместе с тем, следует отметить, что данный препарат обладает бактериостатическим действием, что существенно ограничивает его использование при ИЭ.

Согласно проведённому исследованию доля фторхинолонов при стартовой АМТ составила 6,7%, при смене терапии — 11,2%. С учётом того, что согласно существующим рекомендациям, фторхинолоны входят лишь в схемы терапии ИЭ с доказанной этиологией (бактерии группы НАСЕК, атипичные микроорганизмы), столь частое их назначение является ошибочным.

Парентеральный путь введения АМП при терапии ИЭ является более предпочтительным. Однако в ряде случаев, например, у лиц, длительно

имеющих в анамнезе инъекционную наркоманию, этот путь введения может быть затруднен из-за поражения вен. В связи с этим, в течение последних лет изучается потенциальная возможность применения перорального пути введения препаратов при АМТ у пациентов с ИЭ. Наиболее часто назначаемыми АМП при данном виде терапии являются аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин), фторхинолоны (ципрофлоксацин), оксазолидиноны (линезолид), а также рифампицин. При этом следует отметить, что в случае стафилококковой природы инфекционного процесса, пероральный путь ведения АМП возможен исключительно на фоне положительной динамики двухнедельной парентеральной терапии [10, 11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В., Веселова О.В., Власова Е.Е., Дроздович Е.Л. и соавт. Представления российских врачей об этиологии, диагностике и терапии инфекционного эндокардита. Клинический микробиол и антимикроб химиотер. — 2014. — Т. 16. — № 1. — С. 26—32. / Danilov A.I., Alekseeva I.V., Asner T.V., Veselova O.V., Vlasova E.E., Drozdovich E.L. i soavt. Predstavleniya rossijskikh vrachej ob jetiologii, diagnostike i terapii infekcionnogo jendokardita. Klin mikrobiol i antimikrob himioter 2014; 16 (1): 26—32. [in Russian]
2. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В., Власова Е.Е., Данилова Е.М., Дехнич А.В. и соавт. Этиология инфекционного эндокардита в России. Клинический микробиол антимикроб химиотер. — 2015. — Т. 17. — № 1. — С. 4—10. / Danilov A.I., Alekseeva I.V., Asner T.V., Vlasova E.E., Danilova E.M., Dehnic A.V. i soavt. Jetiologija infekcionnogo jendokardita v Rossii. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2015; 17 (1): 4—10. [in Russian]
3. Данилов А.И., Козлов Р.С., Козлов С.Н., Дехнич А.В. Практика ведения пациентов с инфекционным эндокардитом в Российской Федерации. Антибиотики и химиотер. — 2017. — Т. 62. — № 1—2. — С. 30—34. / Danilov A.I., Kozlov R.S., Kozlov S.N., Dehnic A.V. Praktika vedeniya pacientov s infekcionnym ehndokarditom v Rossijskoj Federacii. Antibiotiki i khimioter 2017; 62 (1—2): 30—34. [in Russian]
4. Моисеев В.С., Котова Е.О., Караулова Ю.Л. Эпидемиология и клиническое течение современного инфекционного эндокардита (по данным муниципальной больницы). — Клинический фарм и тер. — 2014. — Т. 23. — № 3. С. 62—66. / Moiseev V.S., Kotova E.O., Karaulova Ju.L. Jepidemiologija i klinicheskoe techenie sovremennogo infekcionnogo jendokardita (po dannym municipal'noj bol'nicy). Klin pharm i ther 2014; 23 (3): 62—66. [in Russian]
5. Dayer M.J., Jones S., Prendergast B., Baddour L.M., Lockhart P.B., Thornhill M.H. Incidence of infective endocarditis in England, 2000—13: a secular trend, interrupted time-series analysis. Lancet 2015; 385: 1219—1228.
6. Erichsen P., Gislason G.H., Bruun N.E. The increasing incidence of infective endocarditis in Denmark, 1994—2011. European Journal of Internal Medicine 2016; 35: 95—99.
7. Durack D.T., Lukes A.S., Bright D.K. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. Am J Med 1994; 96 (3): 200—209.
8. Li J.S., Sexton D.J., Mick N., Nettles R., Fowler V.G., Ryan T. et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. Clin Infect Dis 2000; 30 (4): 633—638.
9. Cancan Gursul N., Vardar I., Demirdal T., Gursul E., Ural S., Yesil M. Clinical and microbiological findings of infective endocarditis. Journal of Infection in Developing Countries 2016; 10 (5): 478—487.
10. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongiorni M.G., Casalta J.P., Del Zotti F. et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). Eur Hear J 2015; 36 (44): 3075—3128.
11. Nishimura R.A., Otto C.M., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P. III, Guyton R.A. et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol 2014; 63: 2438—2488.
12. Erwin J.P., Otto C.M. Infective endocarditis: old problem, new guidelines and still much to learn. Heart 2014; 100 (13): 996—998.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Данилов Андрей Игоревич — к. м. н., ассистент кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Козлов Роман Сергеевич — д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, директор НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Козлов Сергей Николаевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Дехнич Андрей Владимирович — к. м. н., заместитель директора по научной работе НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Жаркова Людмила Павловна — д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

Оценка активности препаратов, содержащих клеточные линии человека: перспективные подходы и требования регуляторных органов

А. А. ЧАПЛЕНКО, Е. В. МЕЛЬНИКОВА, О. А. РАЧИНСКАЯ, Ю. В. ОЛЕФИР

Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва

Evaluation of the Activity of Drugs Containing Human Cell Lines: Promising Approaches and Requirements of Regulatory Bodies

A. A. CHAPLENKO, E. V. MELNIKOVA, O. A. RACHINSKAYA, YU. V. OLEFIR

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow

В настоящей статье проанализированы новейшие требования регуляторных органов США и Европы к оценке активности препаратов, содержащих клеточные линии человека (аналогов биомедицинских клеточных продуктов); приведён обзор методов и подходов к оценке активности используемых производителями препаратов для клеточной терапии как на разных стадиях клинических исследований, так и уже зарегистрированных. На основании представленных данных сформулированы основные принципы и критерии выбора тех или иных методов оценки активности, а также интерпретации получаемых результатов. Информация, представленная в статье, может быть полезна как производителям биомедицинских клеточных продуктов в Российской Федерации, так и представителям регуляторных органов в процессе экспертизы качества.

Ключевые слова: клеточная терапия, клеточные линии, оценка качества, регуляторные требования.

This article analyzes the latest requirements of the US and European regulatory authorities for the assessment of the activity of preparations containing human cell lines (biomedical cell product analogues); it gives a review of methods and approaches to the assessment of activity used by manufacturers at different stages of clinical studies and for already registered preparations for cell therapy. Based on the presented data, the basic principles and criteria for the selection of various methods for assessing activity, as well as the interpretation of the results obtained, are formulated. The information presented in the article can be useful both to the manufacturers of biomedical cellular products in the Russian Federation, and to the representatives of regulatory bodies in the process of quality examination.

Keywords: cell therapy, cell lines, quality assessment, regulatory requirements.

Введение

В настоящее время основные направления создания инновационных препаратов для медицинского применения определяются одной из двух концепций — использованием клеточных линий (в том числе, генетически модифицированных) для создания молекул, исправляющих патологический процесс в организме, или применением самих клеток в качестве готового продукта. Таким образом, формируются два принципа создания препаратов — биотехнологический и биомедицинский, которые определяют подходы к разработке, производству и стандартизации продукта. Поскольку основным действующим компонентом биотехнологических препаратов являются молекулы органических веществ (или ком-

плексные структуры на основе таких молекул), для оценки качества применяют практически те же методы, что и для классических лекарств. Однако для продуктов, содержащих живые клетки человека, необходимо следовать принципиально новой парадигме доклинических исследований и контроля качества.

В частности, при оценке качества продуктов, содержащих клеточные линии человека, нормируют следующие показатели, отсутствующие в нормативной документации лекарственных средств: жизнеспособность клеток, вирусная и микоплазменная безопасность, активность [1]. Показатель «Активность», в обязательном порядке включаемый в спецификацию биомедицинского клеточного продукта (БМКП) [2], является одним из ключевых, поскольку даёт косвенную интегральную оценку потенциального терапевтического действия препарата. Оценка активности БМКП, как показателя качества,

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 123182 Москва, ул. Щукинская, д. 6. НЦЭ СМП

должна в значительной степени обосновывать исследования эффективности препарата, проводимые в ходе доклинических исследований, при этом метод такой оценки не должен быть связан со значительными финансовыми и временными затратами, ведь срок хранения клеточных препаратов, как правило, весьма ограничен [3]. Для того, чтобы результаты теста активности были объективными и достоверными, метод, с помощью которого он выполняется, должен быть связан с предполагаемым механизмом действия препарата. Нужно иметь в виду, что для ряда видов БМКП (например, мезенхимальные стромальные клетки (МСК) и некоторые схожие с ними прогениторные клетки) не всегда возможно определить единственный механизм терапевтического действия продукта. Так же трудно поддаются характеристике эффекты, связанные с экспрессией вводимыми клетками комплекса сигнальных и регуляторных молекул [4].

Проблема при разработке спецификации БМКП также заключается в высокой вариабельности клеточных линий в зависимости от донора и технологии выделения и культивирования клеточной линии. Как следствие, установить приемлемые границы величин параметров, характеризующих «активность», бывает довольно затруднительно.

Таким образом, актуальной проблемой разработчиков и производителей БМКП является выбор методов оценки активности и интерпретация получаемых результатов. Цель исследования — проанализировать требования к определению вышеуказанного показателя за рубежом, а также охарактеризовать существующие подходы производителей и разработчиков к оценке активности препаратов на основе клеток человека.

Понятие активности для средств медицинского применения

В соответствии с Руководством ICH 6QB29 [5], активность является «количественной мерой биологической активности, основанной на свойстве продукта, связанном с соответствующими биологическими характеристиками».

Исторически, оценка активности была базовой для оценки качества всех видов лекарств (начиная с растений и химических веществ), в частности, когда изучение структуры веществ было сильно ограничено. Проверка активности была единственным способом гарантировать, что действующее вещество обладает заявляемым эффектом. Первые монографии, включаемые в Фармакопеи, содержали показатель «биологическая оценка активности». В настоящее время, для лекарств, действующие вещества которых представляют небольшие органические молекулы с изученной структурой и механизмом действия, включение данного показателя нецелесообразно. Од-

нако для отдельных веществ биологического происхождения, особенно для вакцин, биологическая оценка активности остаётся ключевым показателем, так как их химическая структура не может быть оценена должным образом физико-химическими методами [6–8]. Разработка удобного метода оценки активности, например, для противокклюшной вакцины заняла более 35 лет, а переход к *in vitro* тесту для инсулина — около 10 [9].

Химический состав клеточных продуктов в настоящее время не поддаётся детальному изучению, а механизм действия не всегда полностью описан и зачастую включает множество путей. Содержание (выраженное в единицах массы или в единицах концентрации клеток) не является релевантной мерой биологической активности [9], поэтому для препаратов клеточной терапии необходима разработка специфических методов оценки функциональной и терапевтической активности клеток.

Требования регуляторных органов США и Европейского Союза, гармонизированных международных руководств

Согласно требованиям основного регуляторного органа ЕС Европейского медицинского агентства (ЕМА) показатель «активность» (*potency*) должен быть включен в спецификацию всех продуктов на основе соматических клеток человека [10].

По сути, могут рассматриваться два типа испытаний активности: 1) испытания *in vitro* с использованием клеточных систем и 2) испытания *in vivo* с использованием животных моделей. Основные клеточные свойства, такие как жизнеспособность, самообновление, апоптоз и дифференциация играют ключевую роль для качества, функции и устойчивости клеточного продукта, и их необходимо контролировать в процессе производства и при выпуске продукции. Контроль осуществляют посредством суррогатных (косвенных) маркеров и подходящей технологии (например, анализа профилей генной экспрессии с помощью микрочипов, проточно-цитометрического анализа с иммунофлуоресцентным окрашиванием, клонирования клеток, ПЦР и др.). Испытания активности *in vivo* также могут быть полезны, особенно при наличии экспериментальных животных моделей. При этом маркеры для оценки чистоты и маркеры для активности не должны комбинироваться в одном и том же исследовании [9].

Поскольку действующее начало клеточных продуктов представлено живыми клетками, активность этих продуктов обычно не может быть отнесена к одной специфической клеточной характеристике. Анализ активности, например, клеточных вакцин, будет основываться на сложных

иммунных механизмах, которые зачастую плохо изучены. Определение также усложняется в связи с использованием композиций нескольких антигенов для иммунизации исходных клеток [11].

Для определения механизма действия клеточного препарата, необходима полная характеристика клеточной линии, поэтому на предварительном этапе устанавливают фенотип и функциональные свойства клеток. Исходя из этих характеристик, установленных в доклинических исследованиях, определяют концепцию оценки активности.

Результаты анализа активности должны обеспечивать уверенность в том, что количество вводимых клеток является достаточным для того, чтобы вызвать значимый терапевтический эффект, и находится в установленных пределах от партии к партии. Таким образом, выбранный метод оценки активности должен быть достаточно чувствительным, чтобы обнаружить клинически значимые изменения количества активного ингредиента в единичной дозе клеточного продукта, а методики определения активности должны быть валидированы аналогично методикам количественного определения лекарственных средств [12].

Требования регуляторного органа США (FDA) в целом соответствуют европейским. Согласно рекомендациям FDA, активность определяется как специфическая способность продукта, оцениваемая методами лабораторных исследований и подтверждаемая данными контролируемых клинических исследований, в ходе которых клеточный продукт вводился в рекомендуемой дозировке. Оценка активности может проводиться как *in vitro*, так и *in vivo* (либо включать оба варианта), при этом тесты должны быть специально разработаны для каждого конкретного продукта, чтобы продемонстрировать его эффективность в соответствии с научно обоснованным механизмом действия.

Рекомендации FDA допускают определённую гибкость подходов к определению активности с учётом специфики определяемого продукта при условии соблюдения основных требований и валидации методик [13].

Согласно позиции американского регулятора, не существует какого-либо одного испытания, с помощью которого можно с достаточной точностью измерить свойства препарата, обуславливающие его клиническую эффективность. Производители демонстрируют эффективность с помощью «существенного доказательства», т.е. доказательства того, что препарат будет обладать предусмотренным действием в условиях применения, предписанных, рекомендуемых или предлагаемых в инструкции по применению. Как правило, существенное доказательство эффективности получают в ходе надлежащих и строго контролируемых исследований, проводимых с исполь-

зованием препарата, полученного при неизменном производственном процессе. Испытания для оценки активности являются необходимой частью испытания по характеристике препарата, сравнительных исследований и протоколов стабильности, которые позволяют гарантировать, что во всех фазах клинического исследования используется препарат, полученный при неизменном производственном процессе [15].

В идеальном случае испытание для оценки активности будет отражать механизм действия препарата (т.е. соответствующую терапевтическую активность или предполагаемый биологический эффект). Однако во многих случаях клеточные препараты имеют сложные (например, зависящие от нескольких биологических активностей) и/или не полностью охарактеризованные механизмы действия, затрудняя определение того, какие свойства препарата имеют наибольшее значение для измерения активности. Несмотря на это, необходимо предпринять все усилия для разработки испытаний для оценки активности, которые отражают важные биологические свойства препарата. Например, активность генотерапевтического вектора зависит, как минимум, от двух биологических активностей: способности доставлять генетическую последовательность в клетку и биологического эффекта экспрессируемой генетической последовательности. Поэтому испытание для оценки активности должно включать в себя как оценку полноты доставки вектора, так и измерение биологического эффекта встроенной генетической конструкции [16].

Кроме того, предлагаемый механизм действия препаратов может зависеть более чем от одного активного ингредиента (например, несколько типов клеток, несколько векторов, мультиэпитопные вакцины). В случае с некоторыми сложными препаратами (например, вакцинами на основе опухолевых клеток) может быть неясно, какими именно ингредиентами обуславливается активность. Необходимо отметить, что для каждой серии лекарственного препарата должно быть проведено надлежащее лабораторное исследование соответствия спецификациям на выпуск лекарственного препарата, включая подлинность и концентрацию каждого активного ингредиента. Таким образом, если препарат содержит более одного активного ингредиента, может быть необходимо провести более одного определения для измерения активности препарата, потому что одного определения может быть недостаточно, чтобы измерить активность каждого активного ингредиента. Также при разработке испытания (испытаний) также следует рассмотреть возможные неаддитивные эффекты между активными ингредиентами, такие как интерференция или синергизм [17]. Возможные проблемы, возникающие

Таблица 1. Примеры проблем, возникающих при разработке методик оценки активности клеточных продуктов

Этап жизненного цикла препарата	Трудности, которые могут возникнуть при разработке испытаний для оценки активности клеточных продуктов	Примеры
Получение биоматериала	Естественная вариабельность исходных материалов [14]	• Вариабельность, связанная с аутологичными и аллогенными донорами • Гетерогенность клеточной линии • Подверженная ошибкам репликация вирусов
	Ограниченный размер серии и ограниченный материал для исследования	• Однородная терапия с использованием аутологичных клеток, суспендированных в малом объёме
Производство и контроль качества	Ограниченная стабильность	• Жизнеспособность клеточных препаратов
	Отсутствие соответствующих стандартных образцов	• Аутологичный клеточный материал • Новые генотерапевтические векторы
	Несколько активных ингредиентов	• Несколько клеточных линий, объединённых в готовом препарате • Неоднородные смеси опухолевых клеток, активированных пептидами (peptide pulsed tumor cells) и/или иммуномодулирующих клеток • Сочетание нескольких векторов
Применение препарата	Возможность взаимного влияния или синергизма между активными ингредиентами	• Несколько генов, экспрессируемых одним и тем же вектором • Несколько типов клеток в аутологичных/аллогенных клеточных препаратах
	Сложный механизм действия	• Несколько возможных эффекторных функций клеток • Несколько этапов, необходимых для функционирования, таких как инфицирование, интеграция и экспрессия трансгена • Векторы, содержащие несколько генов
	Метаболический путь препарата в живом организме	• Миграция из места введения • Клеточная дифференцировка в желаемый тип клеток • Вирусная или клеточная репликация • Инфицирование вирусным вектором, сбрасывание оболочки и экспрессия трансгена

при разработке методов оценки активности клеточных продуктов, приведены в табл. 1.

Концепции, используемые разработчиками и производителями для оценки активности клеточных продуктов

Использование матрицы испытаний для оценки активности. Если одного анализа не достаточно для измерения свойств препарата, связанных с его активностью, тогда можно использовать альтернативный подход, например, разработку нескольких дополняющих друг друга испытаний, с помощью которых можно измерить различные свойства препарата, связанные с его качеством, постоянством и стабильностью. При совместном использовании, и при корреляции результатов с соответствующей биологической активностью, эти взаимодополняющие испытания должны обеспечивать надлежащее измерение активности. Подобная совокупность испытаний (называемая матрицей испытаний) может состоять из сочетания биологических, биологических и аналитических или только аналитических испытаний. Матрица испытаний может включать испытания, которые дают количественные данные (например, единицы активности) и/или качественные данные (например, соответствует/не соответствует).

Если качественные испытания используются как часть матрицы испытаний для определения активности при выпуске серии, в исследованиях стабильности или сравнительных исследованиях, вместе с ними должны быть проведены одно или несколько количественных испытаний.

Подтверждение пригодности методов для оценки активности продукта. Для того чтобы продемонстрировать активность с помощью аналитического испытания или матрицы испытаний, используемой в качестве косвенной характеристики биологической активности, следует предоставить достаточный объём научно обоснованных данных. Данные должны быть основаны на статистически обоснованном числе повторностей, серий или образцов, взятых у пациентов. Методами анализа данных должно быть подтверждено наличие корреляции между результатами матрицы испытаний и терапевтической активностью препарата.

Корреляционная связь между результатами предлагаемого метода и биологической активностью может быть установлена с помощью различных подходов, включая сравнение с доклиническими/подтверждающими концепцию исследования данными, данными *in vivo* (полученными на животных или в клинических исследованиях) или биохимическими или цитологическими данными *in vitro*. Следует показать, что с помощью испыта-

ния можно различить активный препарат и неактивную или деградировавшую формы препарата. Соответствие данных, используемых для подтверждения коррелятивной связи между альтернативным испытанием и биологической активностью препарата, оценивается в каждом конкретном случае и зависит от следующего:

- типа и значимости найденной корреляции (корреляций);
- количества собранной информации о препарате;
- насколько хорошо понимается биологическая активность препарата;
- насколько хорошо альтернативное измерение (измерения) отражают биологическую активность.

Как и для любого анализа, для оценки активности сбор данных по характеристике препарата и анализа, обосновывающих выбор анализа, должен начинаться в ранних фазах исследования.

Оценка активности клеточных продуктов, предназначенных для восстановления и регенерации тканей. Испытание *in vivo* может проводиться либо на животной модели, имитирующей запланированное клиническое восстановление/регенерацию ткани, либо может основываться на механизме действия (например, эктопической модели). Испытание *in vitro* может основываться на экспрессии маркеров, которые напрямую или косвенно (суррогатные маркеры) связаны с желаемой биологической активностью, таких как маркеры поверхности клеток, маркеры активации, паттерн экспрессии определённых генов. Также в качестве основного принципа для испытания активности может использоваться физиологическая реакция при определённых условиях, например дифференциации в специфические типы клеток и/или секреции тканеспецифичных белков (например, компонентов внеклеточной матрицы). Однако производитель должен удостовериться, что метод характеристики согласуется с предполагаемым биологическим эффектом *in vivo*.

Исследование активности должно проводиться при использовании определённого количества клеток, которое, по возможности, должно сопоставляться с сертифицированным эталонным препаратом. Активность должна определяться как время, необходимое для получения определённого эффекта (например, восстановления функции или анатомической структуры), или может рассчитываться на основе измерения эффекта, полученного за определённый период времени.

Оценка активности клеточных продуктов с метаболической или фармакологической активностью. Клетки, содержащиеся в БМКП, могут подвергаться химической обработке или генной модификации *in vitro* с целью экспрессии определённых необходимых белков, как например фак-

торов роста, антигенов клеточной поверхности или других молекул, с тем, чтобы поддерживать биологическую реакцию в новой микросреде настолько долго, насколько это необходимо. Поэтому испытания, разрабатываемые для определения активности, должны показывать оценку связанных с активностью свойств активной субстанции, которые могут создаваться не только неизменёнными жизнеспособными клетками, но и другими компонентами.

Если биологическая функция БМКП главным образом основывается на способности клеток секретировать специфическую молекулу (молекулы), например для коррекции метаболического нарушения, стимулирования роста, выработки метаболитов, тогда определение её активности будет основываться на обнаружении продуцируемой активной молекулы (молекул) и ожидаемой биологической активности. Это можно выполнить при помощи традиционных надёжных качественных и количественных аналитических методов (белкового анализа, идентификации нуклеиновых кислот, ВЭЖХ и т.д.). Ту же самую молекулу можно исследовать и в отношении её функции в системах моделей животных, основываясь на предположении о том, что активная субстанция выделяется из клеточного препарата в биологические жидкости (плазму, спинномозговую жидкость, мочу или интерстициальную жидкость) [18].

Использование стандартов и контролей. В протокол методики оценки активности в обязательном порядке включают контрольный опыт, без использования которого теряется достоверность результатов эксперимента. При необходимости (в связи с особенностями выбранного метода) включают также сравнение с соответствующим стандартным материалом для конкретного препарата. Проведение анализа стандартного материала для конкретного препарата и/или контрольных образцов параллельно с анализом самого препарата поможет обеспечить правильность выполнения испытания. Кроме того, контроли помогают установить, что оборудование и реактивы функционируют и используются в установленном порядке. Тщательно продуманный набор контрольных образцов может существенно повысить уверенность в значимости и надёжности результатов испытания.

По возможности, при разработке препарата следует также разработать свои собственные «внутренние» стандартные материалы. К таким стандартным материалам могут относиться надлежащим образом охарактеризованные клинические серии или другие материалы, охарактеризованные заявителем или полученные из другого источника (например, надлежащим образом охарактеризованная клеточная линия с профилем, схожим с профилем препарата заявителя). Долж-

но быть представлено чёткое обоснование того, как и почему был разработан стандартный материал (включая внутренний стандартный материал/контроль для конкретного препарата).

Другие стандартные материалы и стандарты могут оказаться полезными при разработке испытания и могут быть использованы для разработки и квалификации более подходящих внутренних стандартных материалов и/или контролей. Некоторые стандартные материалы, стандарты и контроли уже доступны или в настоящее время разрабатываются для характеристики биологических препаратов и/или для возможных «считывающих» систем, применяющихся в испытаниях для оценки активности. Например, доступны флуоресцентные гранулы/антитела, стандарты размера частиц и руководства, позволяющие выполнить поверку оборудования и определить параметры, приемлемые для количественного проточного цитометрического анализа. В настоящее время также доступны стандартные материалы для аденовируса 5 типа, ретровирусных векторов и векторов аденоассоциированных вирусов 2 типа. Были также описаны стандартные материалы и контроли для лентивирусных векторов.

Следует провести исследования стабильности стандартных материалов параллельно с исследованиями стабильности препарата и установить дату повторного испытания и срок хранения. Более того, необходимо надлежащим образом охарактеризовать каждую новую серию стандартного материала, сравнить её с оригинальной серией, установить соответствующие методики квалификации и, в конечном счёте, валидации новых стандартных материалов. По возможности, необходимо сохранять образцы [3, 4, 8] каждой серии внутреннего стандартного материала для сравнения их с вновь произведённым стандартным материалом, а также готовить их заранее с учётом истечения срока годности стандартных материалов. Использование карт статистического контроля для отображения текущих характеристик и показателей стабильности стандартного материала во время плановых испытаний может быть полезным инструментом контроля качества, позво-

ляющим выявить неблагоприятные тенденции на раннем этапе.

Валидация качественных испытаний. Как обсуждалось ранее, качественные испытания могут быть использованы как часть матрицы испытаний для оценки активности при условии проведения соответствующих корреляционных исследований. Необходимо валидировать все основные параметры качественных испытаний и предоставить обоснование для тех параметров, которые были определены как второстепенные. Например, хотя некоторые валидационные параметры испытания (например, линейность) могут быть не применимы для качественного анализа, по результату которого можно только определить, выдерживает или не выдерживает препарат это испытание, следует использовать соответствующие контрольные образцы для характеристики испытания в отношении специфичности, а также других показателей надлежащего выполнения испытания (например, робастности, пригодности системы).

Без количественных данных было бы трудно продемонстрировать точность и прецизионность, однако при надлежащей разработке анализа (например, достаточное число повторностей) можно продемонстрировать его надлежащее постоянство. В полуколичественных анализах (анализы с высокой изменчивостью количественного результата, например, ответ в животной модели) для определения робастности и постоянства могут использоваться более широкие диапазоны приемлемости. Следует установить критерии приемлемости для контроля и/или стандартного материала при проведении качественного анализа, чтобы определить, являются ли испытания приемлемыми. Если контроли не выдерживают большинства отдельных испытаний, анализ не будет считаться приемлемым. Кроме того, ввиду сложной природы продуктов конкретные обстоятельства определения пригодности анализа будут различными для каждого анализа.

При выборе подходов к оценке активности важно учесть опыт производителей аналогичных или подобных продуктов, примеры некоторых из них представлены в табл. 2.

Таблица 2. Реализованные и одобренные регуляторными органами подходы к оценке активности

Препарат	Статус	Метод оценки активности	Ссылка
Chondro Select (Tigenix) аутологичные хондроциты	Одобен EMA	Оценка экспрессии молекулярных маркеров (мРНК) методом ПЦР	[19]
Provenge (sipuleucel-T) активированные дендритные клетки	Одобен FDA	Оценка экспрессии CD54 методом проточной цитометрии	[20]
AMR-001 (Amorcyte) клетки костного мозга	Фаза I КИ	Тест миграции <i>in vitro</i> CD34+/CXCR4+ клеток в градиенте SDF-1	[15]
Prochymal (Osiris) мезенхимальные стромальные клетки	Одобен в Канаде	Оценка экспрессии TNFR1 методом ИФА	[21]
Multistem (Athersys) стволовые клетки костного мозга	Фаза I КИ	Оценка экспрессии VEGF, IL8 и CXCL5 методом ИФА	[22]
GRN-001 (Geron) клетки-предшественники олигодендроцитов	Фаза I КИ	Оценка секреции ряда нейротрофных факторов методом ИФА	[15]

Заключение

Стратегия оценки активности клеточного препарата должна быть проработана на ранней стадии разработки продукта, не только в рамках оценки качества, но также для построения общей стратегии контроля качества и выпуска продукта. Кроме того, неправильно выбранный метод анализа активности может стать причиной исключения ряда показаний к применению клеточного продукта. Постоянное взаимодействие и обсуждение с регуляторными органами разрабатываемых методов оценки качества является распространённой практикой передовых разработчиков и производителей препаратов клеточной терапии в ЕС и США и позволяет снизить риски данных неблагоприятных последствий.

Для большинства клеточных препаратов основной механизм действия, как правило, частично определён, и он должен являться определяющим при выборе стратегии оценки активности препарата. Релевантный метод оценки активности препарата позволяет вывести качество продукта на новый уровень, отследить даже небольшие нарушения в технологии производства, а также оценить приемлемость замены некоторых параметров (исходных клеток, используемых сред, оборудования и др.).

Как результат анализа требований регуляторных органов ЕС и США, а также опыта разработчиков клеточных продуктов по всему миру, была сформирована упрощённая схема разработки методов оценки активности клеточных продуктов (рисунок), которая может быть использована при формировании спецификации новых клеточных продуктов в России и за рубежом.

Характеристика морфофункциональных свойств клеточной линии и изучение предполагаемых механизмов действия клеточного препарата

Выбор потенциальных косвенных маркеров (в т.ч. физико-химических характеристик) и соответствующих методов анализа

Оценка статистической корреляции между результатами косвенных тестов и зарегистрированной функциональной активностью *in vivo*

Отбор релевантных методик оценки активности и их валидация, построение матрицы испытаний для включения в спецификацию готового продукта и/или для внутрипроизводственного контроля

Схема-план разработки метода оценки активности препаратов для клеточной терапии

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учёта НИР АААА-А18-118021590045-2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Viswanathan C., Ramdasi S., Kulkarni R., Bopardikar A. Quality Management in the Manufacture of Stem-Cell-Based-Products. *J Stem Cells* 2017; 12 (4): 191–199.
2. Приказ МЗ РФ от 19 января 2017 года N 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт». / Приказ МЗ РФ от 19 января 2017 года N 14н «Ob utverzhdenii formy spetsifikatsii na biomeditsinskiy kletochnyy produkt». [in Russian]
3. Stacey G. N., Connon C. J., Coopman K., Dickson A. J., Fuller B., Hunt C. J., Moore H. Preservation and stability of cell therapy products: recommendations from an expert workshop. *Regenerative med* 2017; 12 (5): 553–564.
4. Lipsitz Y. Y., Timmins N. E., Zandstra P. W. Quality cell therapy manufacturing by design. *Natur biotechnol* 2016; 34 (4): 393.
5. ICH Harmonised tripartite guideline specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6B. 10 March 1999.
6. Юнасова Т. Н., Фадейкина О. В., Сидоренко Е. С., Суханова Л. Л., Шитикова О. Ю., Саркисян К. А. и др. Разработка и изучение отраслевого стандартного образца активности вакцины против краснухи. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2015. — № 3. — С. 49–53. / Yunasova T. N., Fadeykina O. V., Sidorenko E. S., Sukhanova L. L., Shitikova O. YU., Sarkisyan K. A. i dr. Razrabotka i izuchenie otraslevogo standartnogo obraztsa aktivnosti vaksiny protiv krasnukhi. Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie 2015; 3: 49–53. [in Russian]
7. Олфир Ю.В. Меркулов В.А., Воробьёва М.С., Рукавишников А.В., Бондарев В.П., Шевцов В.А. Отечественный препарат иммуноглобулина человека для экстренной профилактики и лечения клещевого

энцефалита. Иммунология. — 2015. — Т. 36. — № 6. — С. 353–357. Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Vorob'eva M.S., Rukavishnikov A.V., Bondarev V.P., Shevtsov V.A. Otechestvennyy preparat immunoglobulina cheloveka dlya ekstreynoy profilaktiki i lecheniya kleshchevogo entsefalita. *Immunologiya* 2015; 36 (6): 353–357. [in Russian]

8. Гаврилова Н. А., Черепушкин С. А., Рыкалина Н. В., Обухов Ю. И. Разработка метода определения биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro*. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2016. — № 2. — С. 120–124. / Gavrilova N. A., Cherepushkin S. A., Rykalina N. V., Obukhov Yu. I. Razrabotka metoda opredeleniya biologicheskoy aktivnosti preparatov eritropoetina *in vitro*. Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie. 2016; 2: 120–124. [in Russian]
9. Pimpaneau V., Gianelli F., Trouvin J. H., Poiseau A. D. The challenges of potency assay development for cell-based medicinal products in Europe. *Regul Rapp* 2015; 12 (5): 5–10.
10. Guideline on human cell-based medicinal products. EMEA/CHMP/410869/2006.
11. Guideline on potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment of cancer. EMA/CHMP/BWP/271475/2006 rev.1.
12. Carmen J., Burger S. R., McCaman M., Rowley J. A. Developing assays to address identity, potency, purity and safety: cell characterization in cell therapy process development. *Regenerat med* 2012; 7 (1): 85–100.
13. Guidance for Industry Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products. <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/UCM243392.pdf>
14. Phinney D. G. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem* 2012; 113 (9): 2806–2812.

15. Bravery C. A., Carmen J., Fong T., Oprea W., Hoogendoorn K. H., Woda J., Van't Hof W. Potency assay development for cellular therapy products: an ISCT review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy* 2013; 15 (1): 9—19.
16. Guthrie K., Bruce A., Sangha N., Rivera E., Basu J. Potency evaluation of tissue engineered and regenerative medicine products. *Trends in biotechnol* 2013; 31 (9): 505—514.
17. Samsonraj R. M., Rai B., Sathiyathan P., Puan K. J., Röttschke O., Hui J. H., Cool S. M. Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells* 2015; 33 (6): 1878—1891.
18. Mattar P., Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Frontiers in Immunol* 2015; 6 (560): 1—8.
19. Luyten Frank, Cosimo De Bari, Francesco Dell'Accio. Marker genes for use in the identification of chondrocyte phenotypic stability and in the screening of factors influencing cartilage production. U.S. Patent Application No. 12/515488. 2010.
20. Cheever M. A., Higano C. S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 2011; 17 (11): 3520—3526.
21. Chen G. L., Paplham P., McCarthy P. L. Remestemcel-L for acute graft-versus-host disease therapy. *Exp Opin Biol Ther* 2014; 14 (2): 261—269.
22. Lehman N., Cutrone R., Raber A., Perry R., Van't Hof W., Deans R., Woda J. Development of a surrogate angiogenic potency assay for clinical-grade stem cell production. *Cytotherapy* 2012; 14 (8): 994—1004.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Чапленко А.А. — эксперт 2 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов ИЦЭКЛС ФГБУ НЦЭСМП Минздрава РФ, Москва

Мельникова Е.В. — к. б. н., главный эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов ИЦЭКЛС ФГБУ НЦЭСМП Минздрава РФ, Москва

Рачинская О.А. — к. б. н., эксперт 1 категории лаборатории биомедицинских клеточных продуктов ИЦЭКЛС ФГБУ НЦЭСМП Минздрава РФ, Москва

Олефир Ю.В. — д. м. н., с. н. с., генеральный директор ФГБУ НЦЭСМП Минздрава РФ, Москва

Механизмы формирования антибиотикорезистентности бактерий рода *Campylobacter*

В. В. СТЕЦЕНКО, *Н. Р. ЕФИМОЧКИНА

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва

The Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria of The Genus *Campylobacter*

V. V. STETSENKO, N. R. EFIMOVCHINA

Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow

Антибиотикорезистентность бактерий, контаминирующих пищевые продукты, является в настоящее время одной из наиболее острых проблем здравоохранения. Широкое использование антибиотиков в ветеринарии с лечебной целью, а также в качестве профилактических средств или стимуляторов роста сельскохозяйственных животных и птицы, создаёт условия для селективного давления на бактериальные популяции, приводит к их адаптации и распространению антибиотикорезистентных штаммов эмерджентных пищевых патогенов, к числу которых относятся бактерии рода *Campylobacter*. По данным ВОЗ, кампилобактериозные гастроэнтероколиты сохраняют лидирующие позиции среди острых кишечных инфекций с пищевым путём передачи. Проведён анализ особенностей генетической трансформации и формирования резистентности возбудителей кампилобактериоза к нескольким классам антимикробных препаратов, наиболее часто применяемым в медицине и ветеринарии. Показано, что бактерии рода *Campylobacter* обладают множественными способами усиления устойчивости, которые включают горизонтальную передачу ДНК (через механизм природной трансформации), плазмидный трансфер генов резистентности и хромосомные мутации. Приведены данные о специфических механизмах антибиотикорезистентности *Campylobacter jejuni* к фторхинолонам, тетрациклинам, аминогликозидам, макролидам. Показано, что экспрессия резистентности у *Campylobacter* spp. наиболее выражена в отношении тетрациклинов, что в последние годы привело к быстрому нарастанию до 61–87% доли тетрациклиноустойчивых штаммов среди популяций кампилобактеров, контаминирующих пищевые продукты. Проведён анализ данных, подтверждающих трансфер генов резистентности и тотальную устойчивость *C. jejuni* к фторхинолонам, которая сформировалась в результате длительного воздействия сублетальных доз этих препаратов. Тенденция к формированию устойчивости *C. jejuni* к макролидам, в первую очередь к эритромицину, обусловленная не только хромосомными мутациями, но и наличием трансмиссивной плазмидной резистентности, в настоящее время рассматривается как серьёзная угроза здоровью населения. Поиск новых информативных маркеров антибиотикорезистентности *Campylobacter* spp. позволит делать прогнозные оценки риска формирования устойчивости возбудителей кампилобактериоза к наиболее часто используемым антимикробным препаратам.

Ключевые слова: кампилобактериоз, антибиотикорезистентность, *Campylobacter jejuni*, антимикробные препараты, генетические детерминанты.

Antibiotic resistance of bacteria that contaminate raw food products is currently one of the most acute public health problems. The widespread use of antibiotics for therapeutic or prophylactic purposes in veterinary medicine and as growth promoters for farm animals and poultry creates the conditions for selective pressure on bacterial populations, leading to their adaptation and dissemination of antibiotic-resistant strains of emergent foodborne pathogens, including bacteria of the genus *Campylobacter*. According to the WHO, campylobacteriosis gastroenteritis retains its leading position among the acute foodborne infections. The article analyzes the features of genetic transformation and formation of resistance of *Campylobacter* bacteria to several classes of antimicrobial drugs, most commonly used in medicine and veterinary. It is shown that *Campylobacter* spp. have multiple ways to enhance resistance, which include horizontal DNA transfer (through the mechanism of natural transformation), plasmid transfer of resistance genes and chromosomal mutations. The article presents the data on specific mechanisms of *Campylobacter jejuni* antibiotic resistance to fluoroquinolones, tetracyclines, aminoglycosides, and macrolides. It is shown that the expression of resistance in *Campylobacter* spp. is the most pronounced in relation to tetracyclines, which in recent years has led to a rapid increase to 61–87% of the proportion of tetracycline-resistant strains among the populations of campylobacters, contaminating food products. The analysis of data confirming the transfer of resistance genes and total resistance of *C. jejuni* to fluoroquinolones, which was formed as a result of prolonged exposure to sublethal doses of these drugs, was carried out. The tendency of *C. jejuni* to form resistance to macrolides, primarily to erythromycin, caused not only by chromosomal mutations, but also by the presence of transmissible plasmid resistance, is now considered as a serious threat to public health. The search for new informative antibiotic resistance markers of *Campylobacter* spp. will allow making prognostic assessment of the risk of formation of resistance of campylobacteriosis pathogens to the most frequently used antimicrobial agents.

Keywords: campylobacteriosis, antibiotic resistance, *Campylobacter jejuni*, antimicrobial agents, genetic determinants.

© В. В. Стеценко, Н. Р. Ефимочкина

Адрес для корреспонденции: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д.2/14.

В течение двух последних десятилетий в развитых странах отмечается резкий рост заболеваемости кампилобактериозом, число случаев которого стало превалировать над другими распространёнными диарейными инфекциями бактериальной природы — сальмонеллёзом и шигеллёзом. Широкое распространение кампилобактериоза в различных странах мира и большой социально-экономический ущерб от этого заболевания объясняют его включение Всемирной Организацией здравоохранения в список эмерджентных пищевых инфекций [1, 2].

Бактерии рода *Campylobacter* распространены повсеместно в природе, они присутствуют в организме домашней птицы или теплокровных животных и могут персистировать длительное время в окружающей среде при неблагоприятных условиях. Шесть таксонов рода *Campylobacter*: *C. jejuni* ssp. *jejuni*, *C. jejuni* ssp. *doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* и *C. helveticus* образуют генетически родственную группу термофильных кампилобактеров с оптимальной температурой роста +42°C, обладающих способностью инфицировать человека и теплокровных животных [2, 3].

Наибольшую эпидемиологическую значимость представляют *Campylobacter jejuni*, которые обуславливают до 90% подтверждённых случаев кампилобактериоза. Причины подъёма заболеваемости кампилобактериозом остаются неизвестными. Имеются предположения о его взаимосвязи с повышением доли в питании населения продуктов из птицы, обычным обитателем кишечника которой являются бактерии рода *Campylobacter*, и распространением новых технологий упаковки пищевых продуктов в пленки и модифицированную газовую атмосферу, способствующих сохранности и проявлению биологических свойств возбудителя. Изучение ответов на стрессовые воздействия у бактерий рода *Campylobacter* имеет важное значение для выяснения механизмов приобретения продуктами, загрязнёнными этими микроорганизмами, опасных свойств. Изменения метаболических профилей *C. jejuni* в результате экспрессии генов патогенности рассматриваются как адаптивные процессы, которые во многом зависят от технологических режимов обработки сырья в процессе производства пищевых продуктов и способствуют селекции новых устойчивых штаммов возбудителей.

Общие механизмы защитных свойств *Campylobacter* spp. могут реализоваться в различных вариантах взаимодействия бактерий с окружающей средой, способствуя формированию устойчивых вариантов микроорганизмов как *in vitro*, так и в производственных условиях под влиянием стрессовых техногенных или биологических факторов. Наиболее выраженной тенденцией в изменении свойств *C. jejuni* является повышение

их резистентности к бактерицидным воздействиям, которые обусловлены повсеместным применением антимикробных препаратов (АМП), в том числе антибиотиков и биоцидов.

Антибиотикорезистентность бактерий, контаминирующих пищевые продукты животного происхождения, стала в последние годы проблемой общественного здравоохранения в большинстве стран мира [4–6]. Широкое использование антибиотиков с лечебной целью в медицине и ветеринарии, сопровождающееся формированием резистентных штаммов, приводит к снижению эффективности применения лекарственных средств и создаёт серьёзные проблемы в терапии инфекционных заболеваний. Острое беспокойство вызывают ситуации, когда противомикробные препараты используются в качестве профилактических средств или стимуляторов роста, поскольку воздействие малых доз антибиотиков, применяемых в течение длительного времени, создаёт условия для селективного давления на популяции бактериальных патогенов, приводит к их адаптации и распространению высоко- и мультирезистентных штаммов [7].

В последние годы получены многочисленные сведения о том, что появление антибиотикоустойчивых штаммов возможно не только в клинических условиях, но и в процессе персистенции патогенных бактерий в окружающей среде. Это привело к появлению термина «глобальная резистенция», подразумевающего совокупность всех генов резистентности к антибиотикам в геномах патогенных, условно патогенных и сапрофитных микроорганизмов, живущих в природных условиях различных экосистем [8]. Для изучения этого феномена используются достижения метагеномного анализа, позволяющего определять совокупность всех генов устойчивости к определённому антибиотику в конкретном микробном сообществе, где могут присутствовать и некультивируемые формы микроорганизмов [9, 10].

Возникновение и распространение генов устойчивости, мобильных генетических элементов, и, как следствие, мозаичная структура геномов, играют ведущую роль в эволюции свойств антибиотикорезистентных микроорганизмов.

На современном этапе рассматриваются следующие основные процессы формирования резистентности бактерий рода *Campylobacter* к антимикробным препаратам:

- плазмидный или транспозонный варианты передачи резистентности;
- хромосомный тип передачи резистентности;
- природная (естественная) трансформация генома бактерий *Campylobacter*.

Наибольшее внимание уделяется возможности передачи чужеродной хромосомной ДНК, несущей

Механизмы антибиотикорезистентности *Campylobacter*

Группы антибиотиков	Механизмы	Гены резистентности	Локализация
Фторхинолоны (ципрофлоксацин, налидиксовая кислота)	Мутации субъединицы А ДНК гиразы	<i>GyrA</i>	Хромосомная
Тетрациклины (тетрациклин, доксициклин)	Энзиматическая инактивация, трансмембранная помпа (<i>efflux pump</i>), изменения структуры рибосом	<i>tet(O)</i>	На плаزمиде (67–70% штаммов) или в хромосоме (33%), а также на других мобильных элементах
Макролиды (эритромицин)	Модификация мишени, <i>efflux pump</i>	Метилирование или мутации участков 23S рибосомальной РНК, ген ДНК-метилазы <i>erm (B)</i>	Хромосомная и плазмидная локализация
Аминогликозиды (канамицин, гентамицин)	Продукция аминогликозид фосфотрансфераз	<i>AphA</i>	Плазмидная локализация
β -лактамы (пенициллины)	Продукция β -лактамаз	—	Плазмидная локализация

шей гены резистентности, в микробную клетку реципиента при обычных ростовых условиях (интергеномная рекомбинация). Этот механизм природной трансформации генома бактерий достаточно часто реализуется у отдельных видов кишечных патогенов, включая *Campylobacter* spp. [11, 12]. Наиболее перспективным в этом плане является изучение феномена природной трансформации *C. jejuni* под влиянием стрессовых воздействий, обусловленного формированием биоплёнок как специфического резервуара для генного обмена и контакта с чужеродной ДНК, способствующего появлению мутаций и новых антибиотикорезистентных популяций. Образующиеся в биоплёнках микросистемы обладают оптимальными условиями для выхода из клеток донорской интактной ДНК и включения её в геном реципиента, который приобретает таким образом новые свойства, включая резистентность к антибиотикам [13].

Устойчивость к антибиотикам у бактерий рода *Campylobacter* реализуется в основном за счёт механизма «*efflux pump*» (трансмембранной помпы), синтеза белков, защищающих рибосомы, и хромосомных мутаций. Детерминанты резистентности обычно локализованы на плаزمиде, что обеспечивает их быстрое внутри- и межвидовое распространение. Бактерии рода *Campylobacter* имеют труднопреодолимую систему рестрикции — модификации, которая в большинстве случаев уменьшает поглощение чужеродного генетического материала и естественным образом трансформируется.

Приобретение отдельными штаммами *Campylobacter* новых детерминант патогенности и факторов, обеспечивающих им селективные преимущества в какой-либо экологической нише, приводит к быстрой экспансии вновь сформированного клона. В процессе эволюции подобные события, вероятно, могут происходить неоднократно, вызывая появление новых патогенов, адаптированных к существованию в различных условиях, в частности формирование антибиотикорезистентных бактерий. Известные в настоящее время специфические механизмы появления и

экспрессии антибиотикорезистентности бактерий рода *Campylobacter* [3, 13, 14] приведены в таблице.

Закономерности формирования и проявления признаков резистентности *Campylobacter* могут быть рассмотрены по отношению к отдельным наиболее значимым группам антибактериальных веществ.

Фторхинолоны

Первые сообщения об устойчивости кампилобактерий к фторхинолонам появились в конце 1980 — начале 1990 годов [4, 15, 16]. С тех пор резистентность к данной группе противомикробных препаратов постоянно растёт. Сочетание неадекватного использования фторхинолонов у людей и интенсивного применения данной группы антибиотиков в животноводстве и птицеводстве способствовало распространению резистентных штаммов *Campylobacter* [6, 17, 18].

Наращение антибиотикорезистентности в популяциях *Campylobacter* spp.

Интенсивное использование фторхинолонов в птицеводческих хозяйствах сопровождалось появлением и распространением резистентных штаммов *C. jejuni*, при этом большинство из них за



Наращение антибиотикорезистентности в популяциях *Campylobacter* spp.

короткий промежуток времени превращались из абсолютно чувствительных в антибиотикоустойчивые [19, 20]. По данным Национальной системы мониторинга антимикробной резистентности возбудителей кишечных инфекций в США, при кампилобактериозах, связанных с употреблением мяса кур, в 14% случаев выделяли резистентные к фторхинолонам штаммы *Campylobacter* (рисунок). В отчете Европейского Агентства по безопасности пищи приводятся результаты исследований, проведенных 28 странами Евросоюза по оценке антибиотикорезистентности штаммов нескольких групп возбудителей пищевых зоонозов, включая *Campylobacter jejuni* и *C.coli* [6]. Показано, что штаммы, выделенные от больных людей, а также обнаруженные в мясе птицы (кур-бройлеров, индеек), обладали высокой резистентностью к ципрофлоксацину (в среднем 70%) и налидиксовой кислоте (65%).

Ограничение или прямое запрещение использования фторхинолонов для ветеринарных целей во многих странах, включая Соединенные Штаты, Данию, Австралию и Финляндию [13, 21] способствовало значительному улучшению ситуации и сопровождалось резким снижением уровня фторхинолоновой резистентности. Так, в Австралии при исследовании 150 штаммов *Campylobacter*, выделенных из мяса бройлеров, число устойчивых к фторхинолонам составило не более 2,4%, что коррелировало с низкой частотой резистентности (2%) у клинических изолятов кампилобактеров [21]. В Финляндии ограничение использования фторхинолонов в ветеринарии также привело к низкому уровню устойчивости к этим антибиотикам, что выявлялось при тестировании местных штаммов *Campylobacter*. По данным Датской комплексной программы мониторинга устойчивости к противомикробным препаратам (DANMAP), в 2011 г. резистентными были 11% штаммов *C.jejuni*, выделенных из мяса домашних бройлеров и 57% штаммов, выделенных от импортируемых бройлеров [21]. В США с 2004 г. запрещено применение в ветеринарии в терапевтических целях энрофлоксацина — антибиотика из группы фторхинолонов, из-за опасения, что увеличивающийся уровень резистентности *Campylobacter* к фторхинолонам отразится на повышении устойчивости к данным антибиотикам у штаммов, выделенных от человека [15].

Хинолоны ингибируют синтез бактериальной ДНК, вызывая гибель клеток. Мишенью хинолонов являются два фермента: ДНК-гираза (топоизомераза II) и топоизомераза IV. Эти ферменты совместно участвуют в репликации, транскрипции, рекомбинации и репарации бактериальной ДНК. ДНК-гираза и топоизомераза IV являются гетеротетрамерными белками, состоящими из двух субъединиц А и В. Гены, кодирующие субъ-

единицы А и В, называются *gyrA* и *gyrB* (ДНК-гираза) или *parC* и *parE* (ДНК-топоизомераза IV). Устойчивость к этому классу противомикробных препаратов возникает вследствие замещения аминокислот в целевой области соответствующей топоизомеразы, называемой «участок определения резистентности к хинолону» (QRDR), который расположен на внутренней части ДНК-связывающего домена на поверхности этих ферментов [4, 22]. Устойчивость к фторхинолонам обусловлена, главным образом, хромосомными мутациями в QRDR гена *gyrA*. Мутации в субъединице GyrB у *Campylobacter* не описаны.

Система «efflux pump» (СмеABC), снижающая внутриклеточную концентрацию антибиотиков, является главным механизмом обеспечения антибиотикорезистентности бактерий рода *Campylobacter* к нескольким противомикробным препаратам, включая фторхинолоны и макролиды [4, 7, 23]. СмеABC кодируется опероном, состоящим из трёх генов *смеА*, *смеВ* и *смеС*, ответственных за синтез периплазматического белка, транспортера лекарственного средства внутренней мембраны и белка наружной мембраны, соответственно. Это наиболее распространённая система у *Campylobacter*, которая функционирует в синергизме с мутацией гена *GyrA*, и вызывает устойчивость к фторхинолонам. Инактивация СмеABC подавлением гена *смеВ* или ингибиторами эффлюкса насоса сопровождается повышением чувствительности к различным антибиотикам у штаммов *Campylobacter* (в том числе обладающих врождённой резистентностью). Это свидетельствует о том, что система СмеABC играет ключевую роль в обеспечении как природной, так и приобретённой антибиотикоустойчивости кампилобактерий. Кроме того, при блокировке эффлюкса насоса значения минимальной ингибирующей концентрации (МИС) для ципрофлоксацина снижаются до уровня чувствительных штаммов, у которых обнаружены мутации в гене *GyrA* [4].

Макролиды

Макролидные антибиотики представляют собой большие молекулы (MW>700), они продуцируются преимущественно микроорганизмами рода *Streptomyces* и родственными таксонами [15]. Наиболее распространённым антибиотиком из группы макролидов является эритромицин, синтезируемый *Saccharopolyspora erythraea* [24]. В настоящее время этот антибиотик считается препаратом выбора при лечении инфекций, вызванных *Campylobacter* spp., обладая высокой надёжностью и эффективностью в отношении данного возбудителя. До недавнего времени считалось, что кампилобактеры не обладают генетически закреплённой устойчивостью к эритромицину, поскольку

возникновение резистентности связывали только с возможными мутациями участков 23S рибосомальной РНК (консервативный вертикальный способ передачи устойчивости). Трансмиссивная плазмидная резистентность к эритромицину была впервые описана лишь в 2014 г. при исследовании штаммов *Campylobacter*, выделенных в Китае от продуктивных животных и птиц, при этом уровень резистентности (МИК) достигал очень высоких значений — 512 мг/л [25, 26].

Тенденция к формированию у кампилобактерий устойчивости к макролидам во многих странах рассматривается как серьёзная угроза здоровью населения вследствие повсеместного распространения эмерджентных возбудителей пищевых инфекций. Частота появления резистентных к макролидам штаммов *C. jejuni* на Тайване и в Испании составляла, соответственно, 10 и 11%, тогда как в Болгарии, Сингапуре и Нигерии были зарегистрированы более высокие показатели — 31, 51 и 79%, соответственно [13]. В Европейском Союзе наиболее высокие уровни резистентности к макролидам у *C. jejuni* выявлены на Мальте (10%) и в Италии — 33% [15].

Резистентность к макролидным антибиотикам у *Campylobacter* связана либо с модификацией мишени антибиотика путём метилирования или мутации, либо с нарушением проницаемости клеточной стенки бактерии для этих антибиотиков и оттоком (эффлюксом) антибиотика из бактериальной клетки [15, 23]. Модификации мишени, вызывающие устойчивость к макролидам, могут быть обусловлены точечной мутацией в гене 23S рРНК и посттрансляционными изменениями рибосомных белков L4 и L22 [4, 13, 22–24].

Наиболее распространёнными мутациями, обеспечивающими устойчивость к эритромицину у *C. jejuni* и *C. coli* (МИК >128 мг/л), являются замены остатков аденина в положениях 2074 и 2075 оперона *gmB* гена 23S рРНК. Поскольку эти виды кампилобактеров имеют три копии гена 23S рРНК, у резистентных к эритромицину штаммов связанные с макролидами мутации, как правило, выявляют во всех трёх копиях. Штаммы, имеющие мутации в двух генах 23S рРНК, характеризуются более низкими уровнями МИК. Сведений о резистентных к макролидам штаммах *Campylobacter*, содержащих только одну мутированную копию гена 23S рРНК нет [27]. Устойчивость к эритромицину, как правило, соответствует перекрёстной резистентности к другим макролидам (например, азитромицину и кларитромицину), а также к родственным им препаратам группы линкозамидов (в частности, клиндамицину) и стрептограминовым группам [4].

Другим наиболее значимым механизмом, обуславливающим резистентность к макролидам у *Campylobacter*, является «efflux pump», для

которого описано по меньшей мере восемь различных систем оттока. Одним из них является мультирезистентный насос *СмеABC*, который синергетически функционирует с мутациями 23S рРНК и обеспечивает высокоуровневую резистентность к макролидам. У резистентных к макролидам штаммов *Campylobacter* с мутациями в положениях A2074G или A2075G инактивация *СмеABC* приводит к заметному снижению уровня резистентности, что подтверждает синергетические взаимодействия эффлюксной системы с целевыми мутациями 23S рРНК [24]. Штаммы, обладающие низким уровнем резистентности к эритромицину (МИК 8–16 мг/л), у которых отсутствуют мутации в целевом гене, могут восстанавливать чувствительность к эритромицину после инактивации эффлюксного насоса *СмеABC*, обеспечивающего природную резистентность *Campylobacter*. Штаммы с высокой исходной резистентностью к эритромицину (МИК >128 мг/л) с мутацией в гене 23S рРНК проявляли уменьшение уровня резистентности к эритромицину в 2–4 раза после инактивации *СмеABC*, что подтверждает синергизм действия эффлюксного насоса и целевых мутаций рибосомных белков в обеспечении приобретённой устойчивости к макролидам у *C. jejuni* и *C. coli* [4, 24].

Третий механизм устойчивости к макролидам предполагает снижение проницаемости стенок бактерий для антибиотиков, за счёт экспрессии основного порина наружной мембраны. Порины представляют собой белки наружной мембраны, которые образуют трансмембранные поры, обеспечивая пассивную диффузию гидрофильных молекул. Свойства пор, включая размер и характеристики заряда, лежат в основе их селективности. Порины *C. jejuni* и *C. coli* могут формировать катион-селективные поры, размеры которых ограничивают транспорт антибиотиков с молекулярной массой более 360 MW, таких как макролиды (MW >700). Учитывая, что макролиды считаются эффективными препаратами при лечении кампилобактериоза, они должны обладать способностью проникать через наружную и цитоплазматическую (внутреннюю) мембраны. Поскольку порины обеспечивают водную среду для переноса гидрофильных молекул, считается, что относительно гидрофобные макролиды получают доступ к цитоплазме грамотрицательных бактерий через «гидрофобный путь». По-видимому, этот путь активируется штаммами, несущими мутации в генах синтеза липополисахаридов. Поэтому наружные мембраны этих мутантных штаммов более гидрофобны, чем у исходных штаммов, проявляя повышенную восприимчивость к гидрофобным антибиотикам, включая макролиды [15].

Тетрациклины

Контаминация продуктов бактериями рода *Campylobacter*, несущими детерминанты трансмиссивной тетрациклиновой резистентности, является одной из актуальных проблем безопасности пищи. Широкомасштабное применение антибиотиков тетрациклиновой группы в целях профилактики и лечения сельскохозяйственных животных повышает риск попадания остатков этих препаратов в пищевую продукцию. Данных о частоте обнаружения устойчивых к тетрациклинам *C. jejuni* и механизмах формирования антибиотикорезистентности недостаточно. В последние годы наблюдается нарастание числа тетрациклиноустойчивых кампилобактеров, при этом уровень резистентности в отдельных случаях достигает 61–87% с ингибиторными дозами свыше 64 мг/л [18, 28]. Выявлены значительные различия при сравнении свежевыведенных культур с ранее полученными изолятами (2001–2007 гг.), что указывает на интенсивные процессы формирования тетрациклиновой резистентности в популяциях циркулирующих кампилобактеров (рисунок).

Тетрациклины, в основе антимикробного действия которых лежит подавление синтеза белков бактерий, являются специфическими ингибиторами связывания аминоацил-тРНК с А-участком бактериальной 70S рибосомы. В настоящее время описано 47 генов *tet*, кодирующих различные механизмы резистентности к этим антибиотикам, включая выброс из клетки (эффлюкс), рибосомальную защиту, а также прямую ферментативную деградацию тетрациклинов. Среди резистентных грамотрицательных бактерий наиболее распространён эффлюкс-механизм, среди грамположительных микроорганизмов — механизмы рибосомальной защиты.

Детерминанты резистентности обычно локализованы на плазмидах, что обеспечивает их быстрое внутри- и межвидовое распространение. Гены, определяющие устойчивость к тетрациклину (*tet*) грамотрицательных бактерий, часто обнаруживаются в транспозоне Tn10, передаваемом между ними крупными конъюгативными плазмидами. Плазмидная резистентность к тетрациклину связана с уменьшением его аккумуляции клеткой, обратным транспортом (гены *tetA-tetE*, *tetG* и *tetH*), внутриклеточной инактивацией (*tetX*) и защитой рибосом-мишеней (*tetM* или *tetQ*) [13, 15, 24].

Поскольку тетрациклины представляют собой ингибиторы синтеза липофильного белка, которые используют систему «гидрофобного пути», описанного для макролидов, а также порины наружной мембраны для проникновения в бактериальную рибосому, в основе резистентности кампилобактерий к тетрациклинам лежит изменение рибосомной мишени тетрациклина и эффлюкс. Для прохождения через поры внешней мембраны

тетрациклин связывается с катионами Mg^{2+} ; проникнув через клеточную стенку в периплазматическое пространство, тетрациклин отсоединяется от магния и пассивно перемещается в цитоплазму для связывания с рибосомальной 30S субъединицей, приводя к ингибированию синтеза белка [4].

Резистентность к тетрациклинам у *Campylobacter* обеспечивается геном *tet(O)*, который присутствует у большинства возбудителей кампилобактериоза, включая *C. jejuni* и *C. coli* [4, 29], другие гены резистентности *tet* у кампилобактеров обнаружены не были. Ген *tet(O)*, кодирующий рибосомальные белки защиты (RPPs), расположен на собственной трансмиссивной плазмиде размером от 45 до 58 КБ и обеспечивает высокие уровни резистентности к тетрациклинам (до 512 мг/л). Опубликованы данные о наличии на *tet(O)*-содержащих плазмидах перемещающегося встроенного элемента IS607, аналогичного обнаруженному на хромосоме *Helicobacter pylori*, поэтому не исключено, что другие мобильные генетические элементы, помимо трансмиссивных плазмид, имеют отношение к приобретению и распространению гена антибиотикорезистентности *tet(O)* [4].

Несмотря на то, что высокий уровень устойчивости к тетрациклинам обусловлен только геном *tet(O)*, роль эффлюкса в отношении этих антибиотиков подтверждается увеличением МИК тетрациклина даже при генетической инактивации протонной помпы. Нарушение работы системы *smcG* приводило к повышению (в 4 раза) восприимчивости мутантного штамма по сравнению со штаммом дикого типа. Кроме того, инактивация эффлюксного насоса *SmcABC* путём повреждения *smcB* сопровождалась 8-кратным уменьшением МИК тетрациклина для штамма, у которого не был выявлен ген *tet(O)* [24].

Аминогликозиды и другие антимикробные препараты

Плазмидная резистентность к аминогликозидным антибиотикам (гентамицину, стрептомицину и др.) у кампилобактерий связана с их энзимной модификацией. У *Campylobacter* известно несколько модифицирующих аминогликозид-ферментов, в том числе аминогликозид фосфотрансфераза I, III, IV и VII, аминогликозид аденилтрансфераза и 6-аминогликозид аденилтрансфераза, каждый из которых имеет свои собственные характерные участки модификации и субстраты. Все три фермента действуют по аналогичному механизму: продуцирование 30-О-аминогликозид-фосфотрансферазы, кодируемой геном *aphA-3*. Ген *aphA-3* является наиболее распространённым источником устойчивости к аминогликозидам у *Campylobacter*. Описаны и другие гены, в частности *aphA-1* и *aphA-7*, обеспечивающие резистентность к канамицину [24, 30]. В отличие от *aphA-3* и *aphA-1*, которые, как считается,

были получены путём горизонтального переноса, *aphA-7* имеет сходный G-C состав с хромосомной ДНК *C.jejuni*, свидетельствуя о том, что *aphA-7* свойственен кампилобактерам. Резистентность к канамицину часто опосредуется плазмидой, которая также кодирует устойчивость к тетрациклину и переносится путём конъюгации между штаммами *Campylobacter* [31].

Идентификация генетических детерминант *C.jejuni* позволила установить значительное разнообразие присутствующих маркеров резистентности и высокую степень соответствия фенотипических и генетических профилей антибиотикоустойчивости пищевых изолятов кампилобактерий. У 85 % штаммов, фенотипически устойчивых к аминогликозидам, были выявлены один, два или более генов резистентности *aphA*. У большинства (64%) изученных тетрациклинорезистентных штаммов был обнаружен ген *tetO* [28].

Бета-лактамы антибиотики нарушают сшивание пептидогликанов при образовании клеточной стенки бактерий, что приводит к гибели клеток. Причиной резистентности кампилобактерий к пенициллинам и цефалоспорином являются мутации в генах пенициллинсвязывающих белков. Они приводят к пониженной аффинности этих белков к бета-лактамам антибиотикам. Подавляющее большинство штаммов *C.jejuni* и *C.coli* способны продуцировать β -лактамазы, которые инактивируют молекулу бета-лактама путём гидролиза структурного лактамного кольца. Кроме того, устойчивость к этой противомикробной группе может быть связана с изменениями в структуре мембраны или в поринах и системе эффлюксных насосов [15, 32].

Хлорамфеникол ингибирует биосинтез бактериальных белков, предотвращая элонгацию пептидной цепи. Он обратимо связывается с центром пептидилтрансферазы в рибосомной субъединице 50S. Плазмидная резистентность к хлорамфениколу ассоциируется с наличием у бактерий генов

хлорамфеникол ацетилтрансферазы (*cat*), которая модифицирует хлорамфеникол таким образом, что препятствует его связыванию с рибосомами. Несмотря на то, что резистентность к хлорамфениколу у *Campylobacter* встречается редко, у *C.coli* был обнаружен ген резистентности к хлорамфениколу, расположенный на плазмидах [4, 24].

Резистентность *C.jejuni* к сульфаниламидам (сульфонамидам) также хромосомно опосредована путём мутационного замещения четырёх аминокислотных остатков в дигидроптероатсинтетазе (DHPS), что приводит к пониженной аффинности к этим препаратам [4].

Таким образом, данные о регуляторных системах антибиотикорезистентности и генетических детерминантах резистентных популяций кампилобактеров охватывают различные аспекты закономерностей проявления изменчивости микроорганизмов и роли условий внешней среды как эволюционных факторов, позволяющих возбудителям приобретать ранее малоизвестные селективные признаки патогенности.

Изучение механизмов формирования устойчивости *C.jejuni* к различным антимикробным препаратам позволяет осуществлять поиск новых информативных маркеров резистентности и толерантности бактерий рода *Campylobacter*, прогнозировать интенсивность размножения бактериальных популяций в продовольственном сырье и готовых продуктах, оценивать способность возбудителя к преодолению защитных барьеров макроорганизма с целью разработки более эффективных и точных алгоритмов контроля возбудителя кампилобактериоза. Эти данные также необходимы для создания эффективных систем микробиологического контроля на всех этапах сельскохозяйственного производства, переработки и хранения пищевых продуктов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 15-16-00015-П).

ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization. The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9–11 July 2012. // ISBN 978 92 4 156460 1. www.who.int
- Campylobacter Ecology and Evolution. / 2014, Caister Academic Press, Norfolk, UK, edited by S.K. Sheppard. 359, ISBN: 978-1-908230-2.
- Nachamkin I., Guerry P. Campylobacter infections. Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. Wymondham, 2005; 285–293.
- Wieczorek K., Osek J. Antimicrobial Resistance Mechanisms among Campylobacter. BioMed Research International 2013; 2013: 1–12.
- John E., Moore N., Barton M.D. The epidemiology of antibiotic resistance in Campylobacter. Microb Infect 2006; 8: 1955–1966.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA J 2016; 14: 2: 4380. www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- Mavri A., Ribič U., Možina S.S. The Biocide and Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food 2015; 269–283.
- Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объем, разнообразие и развитие. Антибиотики и химиотер. — 2013. — Т. 58. — № 5–6, С. 38–48. / Vinogradova K.A., Bulgakova V.G., Polin A.N., Kozhevnikov P.A. Ustoychivost' mikroorganizmov k antibiotikam: rezistoma, ee ob'em, raznoobrazie i razvitie. Antibiotiki i khimioter 2013; 58: 5–6: 38–48. [in Russian]
- Aminov R.I. and Mackie R.I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. FEMS Microbiol Lett 2007; 271: 2: 147–161.
- Monier J.-M., Demanèche S., Delmont T.O. et al. Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. Curr Opin Microbiol 2011; 4: 3: 236–243.
- Bae J., Oh E., Jeon B. Enhanced transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* biofilms by natural transformation. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58: 12: 7573–7575.
- Gangaiah D., Kassem I.I., Liu Z., Rajashekara G. Importance of polyphosphate kinase 1 for *Campylobacter jejuni* viable-but-nonculturable cell formation, natural transformation, and antimicrobial resistance. Applied Environ Microbiol 2009. — vol.75. — No 24. — p.7838–7849.
- Alfredson D.A., Korolik V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. FEMS Microbiol Lett 2007; 277: 123–132.

14. Wang Y., Dong Y., Deng F., Liu D., Yao H., Zhang Q. et al. Species shift and multidrug resistance of *Campylobacter* from chicken and swine, China, 2008-14. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 666–669.
15. Iovine N.M. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence* 2013; 4: 3: 230–240.
16. Acheson D., Allos B. M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 8: 1201–1206.
17. Man S.M. The clinical importance of emerging *Campylobacter species*. *Natur Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 12: 669–685.
18. Ефимочкина Н.Р., Короткевич Ю.В., Стеценко В.В., Пичугина Т.В., Быкова И.Б., Минаева Л.П., Шевелева С.А. Антибиотикорезистентность штаммов *Campylobacter jejuni*, выделенных из пищевых продуктов. *Вопросы питания*. — 2017. — № 1. — С.18–28. / Efimochkina N.R., Korotkevich Yu.V., Stetsenko V.V., Pichugina T.V., Bykova I.B., Minaeva L.P., SHeveleva S.A. Antibiotikorezistentnost' shtamov *Campylobacter jejuni*, vydelennykh iz pishchevykh produktov. *Voprosy pitaniya* 2017; 1: 18–28. [in Russian]
19. McDermott P.E., Bodeis S.M., English L.L., White D.G., Wagne D.D. High-level ciprofloxacin MICs develop rapidly in *Campylobacter jejuni* following treatment of chickens with sarafloxacin. In: American Society for Microbiology, 101st Annual Meeting, Orlando, Florida, ASM Press, Washington, D.C. (2001), p. 742 Abstract Z-20.
20. Unicomb L. E., Ferguson J., Stafford R. J. et al. Low-level fluoroquinolone resistance among *Campylobacter jejuni* isolates in Australia. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 10: 1368–1374.
21. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. 2012; ISSN 1600-2032: 80–83.
22. Payot S., Bolla J. M., Corcoran D. et al. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter*spp. *Microb Infect* 2006; 8: 7: 1967–1971.
23. Olkkola S. Antimicrobial Resistance and Its Mechanisms among *Campylobacter coli* and *Campylobacter upsaliensis* with a special focus on streptomycin. *Dissertationes Schola Doctoralis Scientiae Circumiectionis, Alimentariae, Biologicae*. 2016.
24. Hannula M. Mechanisms and development of antimicrobial resistance in campylobacter with special reference to ciprofloxacin university of Helsinki. Faculty of Veterinary Medicine. 2010; 73: 1–73.
25. Qin S., Wang Y., Zhang Q., Deng F., Shen Z., Wu C. et al. Report of ribosomal RNA methylase gene erm(B) in multidrug resistant *Campylobacter coli*. *Antimicrob Chemother* 2014; 69: 964–968. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt492/>
26. Wang Y., Zhang M., Deng F., Shen Z., Wu C., Zhang J. et al. Emergence of Multidrug-Resistant *Campylobacter Species* Isolates with a Horizontally Acquired rRNA Methylase. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 5405–5412.
27. Vacher S., Menard A., Bernard E., Santos A., Megraud F. Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 40–47.
28. Ефимочкина Н.Р., Стеценко В.В., Быкова И.Б., Маркова Ю.М., Полянина А.С., Алешикина А.И., Шевелева С.А. Исследование фенотипической и генотипической экспрессии антибиотикорезистентности *Campylobacter jejuni* под влиянием стрессовых воздействий. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2017. — Т. 164. — № 10. — С. 464–472. / Efimochkina N.R., Korotkevich YU.V., Stetsenko V.V., Pichugina T.V., Bykova I.B., Minaeva L.P., SHeveleva S.A. Antibiotikorezistentnost' shtamov *Campylobacter jejuni*, vydelennykh iz pishchevykh produktov. *Voprosy pitaniya* 2017; 1: 18–28. [in Russian]
29. Laprade N., Cloutier M., Lapen D. R. et al. Detection of virulence, antibiotic resistance and toxin (VAT) genes in *Campylobacter species* using newly developed multiplex PCR assays. *J Microbiol Methods* 2016; 124: 41–47.
30. Sahin O., Shen Z., Zhang Q. Methods to study antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter jejuni*. Humana Press, New York, NY. 2017; 29–42.
31. Gibreel A., Tracz D.M., Nonaka L., Ngo T.M., Connell S.R., Taylor D.E. Incidence of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with Special Reference to tet(O)-Mediated Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 9: 3442–3450.
32. Zhang Q., Plummer P.J. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Campylobacter*, Third Edition. Amer Soc Microbiol 2008; 263–276.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Стеценко Валентина Валерьевна — аспирант лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), Москва

Ефимочкина Наталья Рамазановна — д.б.н, ведущий научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва

Фукоиданы бурых водорослей: влияние элементов молекулярной архитектуры на функциональную активность

С. Р. ХИЛЬЧЕНКО¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ², Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА³, Н. М. ШЕВЧЕНКО³, Н. Н. БЕСЕДНОВА²

¹ Любекский институт экспериментальной дерматологии, Любек, Германия

² НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток

Fucoidans from Brown Algae: the Influence of Molecular Architecture Features on Functional Activity

S. R. KHILCHENKO¹, T. S. ZAPOROZHETS², T. N. ZVYAGINTSEVA³, N. M. SHEVCHENKO³, N. N. BESEDNOVA²

¹ Lübeck Institute of Experimental Dermatology (LIED), Lübeck, Germany

² Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

³ G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok

В обзоре рассмотрены вопросы истории открытия и номенклатуры фукоиданов — интересной группы фукоз-содержащих сульфатированных полисахаридов бурых водорослей (*Phaeophyceae*), отличающихся широким спектром биоактивных свойств. Охарактеризованы факторы, обуславливающие сложное строение этих гетерогенных биополимеров, обобщены экспериментальные исследования, посвящённые выяснению роли элементов структуры молекулы биогликанов (химических групп, молекулярной массы, гликозидных связей, моносахаридов) на некоторые биологические свойства — антикоагулянтные, противовоспалительные, антиоксидантные и др. Отмечено, что несмотря на продолжительную историю изучения фукоиданов, понимание ассоциации тех или иных фармакофорных свойств в контексте особенностей молекулярной структуры далеко от своего завершения из-за чрезвычайной сложности структуры молекул, обусловленной как эндо- так и экзогенными (экологическими) факторами, а также из-за проблем воспроизводимости экстракции препаратов фукоиданов. Источники литературы были агрегированы из каталогов библиотек и электронных баз данных (PubMed, Web of Science, Science Direct).

Ключевые слова: фукоидан, бурые водоросли, *Phaeophyceae*, сульфатированные полисахариды, сульфатированные фуканы, связь структуры и функции.

The review covers the history of the discovery and nomenclature of fucoidans — an interesting group of fucose-containing sulfated polysaccharides extracted from brown algae (*Phaeophyceae*) with a wide range of promising biological activities. The factors affecting complex molecular structure of these heterogeneous biopolymers are characterized; the authors give an overview of a series of original articles clarifying the role of the bioglycan molecular structure elements (chemical groups, molecular weight, glycosidic linkages, monosaccharides) on some biological properties — anticoagulant, anti-inflammatory, antioxidant, etc. Despite a long history of studying fucoidans, unraveling the role of certain fucoidans' structural features is far from being complete because of the molecular complexity caused by both endogeneous and environmental factors, as well as by reproducibility issues of extraction processes. The sources of scientific literature were found in various electronic databases (PubMed, Web of Science, Science Direct) and library search.

Keywords: fucoidan, brown algae, *Phaeophyceae*, sulfated polysaccharides, sulfated fucans, structure-activity relationship.

В обзоре представлена история изучения и номенклатура фукоиданов — важной группы фукоз-содержащих сульфатированных полисахаридов бурых водорослей. Рассматривается их физиологическая роль, обсуждается вопрос об особенностях строения и факторы, их обуславливающие. Обсуждаются некоторые биоактивности данных полисахаридов в свете параметров их молекулярной структуры.

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции:

e-mail: stanislav.khilchenko@uksh.de

Историческая справка и номенклатура

Термин «фукоидин» был впервые предложен в 1913 г. Н. Kylin для обозначения полисахарида, выделенного им из бурой водоросли. Позже Е. Vasseur опубликовал сообщение о том, что подобные соединения встречаются и у морских беспозвоночных, а в 1959 г. впервые упоминается термин «фукоидан» [1].

Номенклатура фукоиданов до сих пор не является общепринятой. По рекомендациям ИЮПАК «сульфатированный фукоидан» — это полисахарид, построенный, главным образом, из остатков

L-фукозы с содержанием других углеводов менее 10% [1]. Этот термин применяют к фукозосодержащим полисахаридам, выделенным из морских беспозвоночных, тогда как «фукоидан» — к сульфатированным гетерополисахаридам из морских водорослей [2, 3]. Однако, зачастую, это негласное правило [4] не соблюдается [5]. Терминология, используемая в цитируемых работах, для строгости изложения и облегчения понимания будет заменяться предложенной, не искажая сути источника.

Источники и физиологические функции фукоиданов

Известные представители фукоиданов выделены из морских бурых водорослей (*Phaeophyceae*), среди которых этими полисахаридами богаты, главным образом, представители порядков *Fucales* и *Laminariales* [6]. С другой стороны, фукоиданы не всегда можно выделить из классических источников (бурых водорослей). Так, в талломах *Alaria marginata* и *A. fistulosa* фукоиданы обнаружить не удалось [7]. Однако спорофилы этих водорослей содержали значительные количества фукоиданов [8].

Сульфатированные фукуаны экстрагируют из морских беспозвоночных — морских ежей (*Echinoidea*) [9] и голотурий (*Holothuroidea*) [10].

О физиологической роли фукоиданов известно, что, наряду с полифенолами и альгиновой кислотой, фукоиданы синтезируются в аппарате Гольджи, затем в везикулах транспортируются к плазмолемме, секретируются и инкорпорируются в клеточную стенку [11]. Полагают, что они связывают альгинаты и целлюлозу, образуя трёхмерный каркас [12], а также ответственны за ретенцию воды во время отливов, являясь механизмом адаптации галофитов (в т.ч. водорослей) [13].

Исследование структуры фукоиданов методом масс-спектрометрии

Особое место среди инструментов изучения структуры фукоиданов занимает масс-спектрометрия (МС), сущность которой, заключается в регистрации и измерении отношений массы (m) к заряду (z) ионов, образующихся при ионизации исследуемого вещества.

В настоящее время наиболее распространены матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ), метод «мягкой» ионизации, обусловленной воздействием импульсов лазерного излучения на матрицу с аналитом, и ионизация электрораспылением (ИЭР), позволяющая перевести формирующиеся ионы вещества из раствора в газовую фазу.

Развитие МАЛДИ МС и ИЭР МС существенно расширило возможности масс-спектрометрии углеводов, а комбинация нескольких этапов масс-

анализа в совокупности с процессами диссоциации и с химическими реакциями, вызывающими изменения в массе или заряде ионов, позволяет проводить тандемную МС (МС/МС), что даёт возможность выбирать «родительский» ион с его последующей фрагментацией. На что значительное влияние оказывает набор факторов: метод ионизации, масс-анализатор, моносахаридный состав, тип связей, природа заместителей и др. Тем не менее, в процессе фрагментации наблюдается ограниченное число серий фрагментных ионов, что даёт возможность их систематизировать.

Стоит отметить, что эффективность ионизации нейтральных олигосахаридов методом МАЛДИ МС остаётся постоянной с увеличением размеров молекулы, в отличие от ИЭР МС, где эффективность ионизации уменьшается с увеличением молекулярной массы [14]. Однако, поли- и олигосахариды, несущие остатки ортофосфорной, серной, сиаловых кислот, успешно анализируются ИЭР МС в режиме регистрации отрицательных ионов, когда практически не происходит отрыва лабильных кислотных групп, и в режиме МС/МС формируются интенсивные фрагментные ионы, несущие информацию о типе связи, последовательности моносахаридов, разветвлениях и сайтах присоединения заместителей. Однако без химической или химико-ферментативной модификации (фрагментации) исследуемых аналитов установить аномерную конфигурацию гликозидных связей и различить диастереоизомеры часто не представляется возможным.

Существующие методы модификации полисахаридов до олигосахаридов подходящих размеров, включают помимо ферментов [15] также частичный кислотный гидролиз. Так, Daniel и соавт. использовали 0,75 мМ H_2SO_4 при $+60^\circ C$ для гидролиза фукоидана из *A. nodosum* с последующим выделением олигосахаридов и анализом с помощью ИЭР МС/МС [16].

Для фрагментации сульфатированных полисахаридов можно применять и автогидролиз, представляющий собой мягкий кислотный гидролиз с участием собственных сульфатных групп в качестве источника кислоты. Так, при исследовании сульфатированного галактана из красной водоросли *Gigartina skottsbergii* с помощью ЯМР-спектроскопии и МАЛДИ МС был использован указанный способ получения олигосахаридов [17]. Автогидролиз проводили при концентрации полисахарида 10 мг/мл 11 ч. при $+60^\circ C$.

Отметим, что при автогидролизе структура образующихся олигомеров может зависеть от положения сульфатных групп в исходном полисахариде, а продукты фрагментации полисахарида, полученные автогидролизом и частичным кислотным гидролизом, могут отличаться из-за раз-

личной чувствительности связей к условиям используемого метода.

Для фукоиданов широко применяется сольволиз как наиболее щадящий метод при необходимости их десульфатирования. Однако особенность их структуры такова, что даже в этих условиях происходит разрушение, как правило, большей части их молекул и выход несущей информацию о строении фракции составляет 7–40% от нативного полисахарида [2].

Современные методы МС для исследования фукоиданов стали использоваться относительно недавно [16, 18] т.к. последние представляют сложный объект для изучения.

Структура фукоиданов

Фукоиданы — полисахариды бурых водорослей — представляют собой семейство гомо- и гетерополисахаридов. Представляя собой полимерные полианионы с разнообразными молекулярными массами (М. м.), последние зачастую имеют разветвлённую структуру с нерегулярным чередованием остатков фукозы, несущих сайты ацелирования и (или) сульфатирования. Если гомополисахариды (фуканы) редко встречаются в водорослях [19], то гетерополисахариды — это типичные компоненты их химического состава. Они содержат «случайные» вставки нейтральных моносахаридов, иногда — уроновых кислот. Чаще всего это галактофуканы или гетерополисахариды, обладающие уникальным строением, например, ксило- или маннофукоглюкуронаны.

Иная ситуация обстоит с сульфатированными фуканами морских беспозвоночных — линейными полимерами, построенными из остатков всё той же α -L-фукозы. И, если для фукоиданов бурых водорослей регулярность скорее крайне редкое исключение [19], то для сульфатированных фуканов морских беспозвоночных это устойчивая закономерность [20].

Олигосахаридные тандемы Хотя структуры, прежде всего фукоиданов, соединений с «хаотичной» молекулярной организацией, и отчасти регулярных сульфатированных фуканов, до настоящего времени остаются предметом активного изучения и уточнения [21], благодаря применению высокочувствительных методов (включая ЯМР-спектроскопии, МС) в сочетании с указанными методами фрагментации, можно вычленивать т.н. олигосахаридные повторы (блоки), из которых построены цепи этих биогликанов.

Рассмотрим несколько примеров получения тандемов, определения их структуры и расчёта степени их полимеризации. Так, анализ методом МАЛДИ МС продуктов расщепления фракции LgF2 фукоидана бурой водоросли *Sacharina gur-*

janovae, образовавшихся в процессе сольволитического десульфатирования и частичного кислотного гидролиза, позволяет сделать вывод о том, что фукоидан из *S.gurjanovae* является сульфатированным галактофуканом, построенным из блоков, состоящих из фукозы и галактозы. Из данных МС-спектров следует, что в условиях сольволиза разрушаются предпочтительно фрагменты полисахарида, построенные из остатков галактозы, а при частичном кислотном гидролизе — из остатков фукозы [18]. Протяжённость блоков, построенных из фукозы, полученных в процессе сольволиза достигала 2–11, тогда как в продуктах частичного кислотного гидролиза преобладали галактозосодержащие олигосахариды длиной 2–5 мономеров.

В результате деполимеризации путём сольволитического десульфатирования фукоидана из бурой водоросли *F.evanescens*, выделенного по методу [22], был получен набор олигосахаридов со степенью полимеризации до 6. Этот фукоидан содержал участки, построенные из (1→3)-связанных остатков α -L-Фиср (до трёх), сульфатированных в основном в положении С2 [23]. Впервые было показано, что остатки ксилозы и галактозы включены в цепь фукоидана. Ранее только для фукоидана бурой водоросли *F.serratus* было показано наличие до шести β -(1→4)-связанных остатков ксилозы, входящих в основную цепь [24].

Фукоза и минорные моносахариды. Преобладающим (мажорным) мономером молекулы фукоидана является α -L-фукопираноза — практически единственная 6-дезоксигексоза, присутствующая в бурых водорослях, — её содержание может достигать >99% (как в фукоидане Ног-1 из *Sargassum horneri* [25]). Однако, например, в молекуле фукоидана из *S.fusiforme* встречаются участки, лишённые этого углевода [26]. К минорным компонентам углеводной цепи фуканов, функциональное значение которых остаётся неоднозначным [27], относят остатки маннозы, ксилозы, рамнозы, галактозы, глюкозы, уроновых кислот в различных соотношениях. Соотношение фукозы и минорных компонентов варьирует. Например, полисахарид из *S.horneri* состоит из 96% α -L-фукозы и 4% глюкуроновой кислоты [28], тогда как состав фукоидана из *Undaria pinnatifida* представлен фукозой ($\approx$ 79%) и галактозой ($\approx$ 21%) [29].

Гликозидные связи. В целом, для сульфатированных фуканов характерен один тип (или его доминирование) гликозидной связи на молекулу. Например, в сульфатированных фуканах морских беспозвоночных *S.franciscanus*, *S.purpuratus*, *S.droebachiensis*, *S.pallidus*, *Lytechinus variegatus* обнаруживают α -(1→3)-связи, а в полисахариде из *Arbacia lixula* — α -(1→4) [10].

В некоторых фракциях фукоиданов бурых водорослей — *L.saccharina* [30], *C.okamuraanus* [31],

Analipus japonicus [27], *Cystoseira indica* [5] — также обнаруживают только один тип α -(1→3)-связей. Для других же фукоиданов, например, из *A.nodosum*, *F.vesiculosus* α -(1→3)-связь чередуется с α -(1→4), а в фукоидане Ног-1 из *S.horneri* находят дополнительную α -(1→2)-связь [25]. Фукоидан из бурой водоросли *F.evanescens*, по одним данным [2], представлял линейную цепь с равномерно чередующимися 3- и 4-связанными остатками α -L-Фусп, сульфатированными в положении С2 (реже С2 и С4). По другим данным [22], этот фукоидан является α -L-фуканом с соотношением связей (1→3:1→4 = 3,5:1).

В зависимости от гликозидных связей различают фукоиданы типа I, когда остатки L фукопиранозы соединены между собой α -(1→3)-О-гликозидными связями, и фукоиданы типа II, когда в молекуле встречаются и α -(1→3)- и α -(1→4)-О-гликозидные связи [31].

Сульфатные и ацетильные группы. Сайты ацетилирования у фуканов находятся в С5 положении фукопиранозы [31]. Несмотря на то, что паттерн ацетилирования может носить случайный характер [2], иногда (в случае фукоидана из *F.evanescens*) удаётся выделить фракции с преимущественной С3-локализацией ацетильных групп [32].

В настоящее время сообщений о несульфатированных фукоиданах нет [1]. Однако содержание сульфатов варьирует и составляет у фукоиданов от ≈20% из *A.nodosum*, *F.vesiculosus* и *Saccharina longicruris* [33] до ≈44% из *F.vesiculosus* [34].

Фукоиданы могут быть сульфатированы по положению С2, реже по С4 (*F.vesiculosus* [35], *A.nodosum* [35]), только С4 (*L.saccharina* [30], *C.okamuranus* [36, 37]), *C.indica* [5], С3 (*L.saccharina* [30]) остатков α -L-Фусп главной цепи или в нескольких сайтах как во фракции 1→3- α -L-фукана из *Saccharina cichorioides*, сульфатированного по С2 и С4 [38].

Ветвление. Наличие боковых цепей характерно для фукоиданов бурых водорослей [20] (в отличие от сульфатированных фуканов беспозвоночных) и является дополнительным источником их разнообразия. Ветви чаще всего представлены остатками фукозы (для фукоиданов из *C.filum* [39], *L.saccharina* [30], *F.serratus* [24]), урсонных кислот (*C.okamuranus* [36]), которые присоединены посредством α -гликозидных связей к С2 (*L.saccharina* [30]), *C.okamuranus* [37]), *C.indica* [5]) или С4 (*F.serratus* [24]) остатков α -L-фукозы.

Конформация. Для фуканов, высокомолекулярных полианионов, характерна вытянутая структура — отрицательные заряды, сообщаемые сульфатными, ацетильными и гидроксильными группами, заставляют молекулу принимать в растворе вытянутую спиралевидную форму [40].

Факторы, влияющие на структуру фукоиданов

Прежде, чем приступить к рассмотрению влияния строения фукоиданов на их биологическую активность, оговорим известные факторы, обуславливающие сложность их молекулярной структуры.

Стадия онтогенеза. Описаны свидетельства корреляции между химическим составом фукоиданов в бурых водорослях и жизненным циклом. Так, М. Нонуа и соавт. показали [41], что содержание сульфатов и фукозы в фукоидане из *Laminaria japonica* постепенно возрастает с апреля, достигая максимума в сентябре, с последующим снижением к концу года. Изменение содержания галактозы было практически противоположным. В зависимости от сезона года были различными и М. м. фукоиданов из *S.cichorioides* [42]. Т. Kimura и соавт. считают, что содержание фукоидана зависит от стадий развития *S.horneri* [43]. Авторы продемонстрировали, что в ранней стадии развития (январь—февраль) водоросль содержит до ≈1 г фукоидана на 100 г сухой массы, достигая до ≈8 г на последней (апрель—май).

Экологические факторы. Внешние факторы среды, такие как солёность морской воды, также могут влиять на содержание и химический состав полисахаридов [13]. На примере *Ruppia maritima* авторы показали устойчивую зависимость между уровнем солёности воды в эксперименте и содержанием полисахаридов в растении. Также существует зависимость между ареалом вида водорослей и их химическим составом [44].

Методы экстракции. Метод экстракции также влияет на количественный и качественный состав фукоиданов [33]. Например, С. Yang и соавт. сообщают, что более жёсткий гидролиз фукоидана из *U.pinnatifida* в микроволновой печи приводил к снижению не только М.м., но и большему десульфатированию молекулы, нежели при гидролизе в воде при +100°C, что оказалось критичным для противоопухолевой активности фукоидана [45]. В работе [46] отмечено, что водная экстракция фукоиданов из *Adenocystis utricularis* при комнатной температуре характеризовалась низким выходом (≈3%) продукта с содержанием сульфатов ≈30% и урсонных кислот 8%, тогда как экстракция с помощью HCl (pH 2,0) при температуре +70°C позволила получить более высокий выход (≈10%) продукта с более низкой степенью сульфатирования (≈10%) и повышенным содержанием урсонных кислот (≈30%).

Отметим, что в экстрактах фукоиданов могут присутствовать (часто недиагностируемые [47]) полифенолы [48] и белки [34, 46]. Например, для фукоидана из *P.gymnospora* содержание белка может составлять до ≈2,6 г / 100 г сухой массы [34].

Влияние молекулярной структуры фукоиданов на биологические свойства

Антикоагулянтная, иммуномодулирующая [49], противовирусная [50], антибактериальная [51], противоопухолевая [52], ангиотропная [53] — далеко неполный список фармакофорных свойств, обнаруженных у фукоиданов к настоящему времени. Эта богатая гамма биоактивностей заставляет искать конкретные черты строения молекулы, ответственных за ту или иную функциональную активность данных биогликанов. Работы, свидетельствующие о неспецифической роли отрицательного заряда молекулы, преобладают в литературе, тем не менее некоторые исследователи не оставляют попыток выяснения влияния тех или иных функциональных химических групп в молекуле фукоиданов на их биоактивность. В данной части рассмотрим влияние некоторых структурных элементов молекулы фукоиданов на их биологические свойства.

Химический состав. Согласно литературным источникам, минорные компоненты фукоиданов играют немаловажную роль в проявлении ими интересных биологических свойств. Так, например, данные, свидетельствующие о роли химического состава молекулярного остова фукоиданов, приводятся в работе [46], где авторы исследовали действие галактофукана и уронофукана из бурой водоросли *A. utricularis*. Авторы показали, что первый, содержащий в основном галактозу и фукозу, проявлял высокую ингибирующую активность в отношении вируса простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типов, тогда как уронофукан, содержащий помимо фукозы, глюкозу, ксилозу, рамнозу, галактозу и в большом количестве уроновые кислоты, не обладал противовирусной активностью. D. J. Schaeffer и V. S. Krylov в своём обзоре [54] также сообщают, что сульфатированные гомополисахариды более активны по отношению к вирусу иммунодефицита человека, чем гетерополисахариды. Ряд других примеров также подтверждает эту точку зрения. В публикации [55] сообщили, что фракция фукозосодержащих сульфатированных полисахаридов из *Ecklonia kurome* обладала антитромбиновыми свойствами. Причём, наибольшая активность в тесте активированного частичного тромбопластинного времени была у фракций, которые не содержали маннозу и ксилозу, а содержание галактозы и глюкуроновой кислоты было намного меньше, чем у других фракций, и содержали примерно на 50% меньше сульфатов. С другой стороны, было показано, что повышение антикомплементарной активности фукоидана из *A. nodosum* сопровождалось увеличением содержания галактозы и глюкуроновой кислоты в молекуле [56].

Однако в некоторых исследованиях установить связь между углеводным составом остова

фукоиданов и их биологической активностью не удаётся. Так, в работе [57] авторы пришли к выводу о том, что антикоагулянтная активность фукоиданов не была связана с содержанием фукозы или других нейтральных сахаров.

Гликозидные связи. А. Cumashi и соавт. в своих исследованиях приходят к выводу, что тип гликозидных связей в молекуле фукана, скорее всего, не играет большой роли для проявления биологических свойств [31]. Эту мысль разделяют Ushakova и соавт., проанализировав структурно-функциональные особенности фукоидан из *L. saccharina* (содержит α -(1→3)-связи) и *F. distichus* (сочетает α -(1→3)- и α -(1→4)-связи) с выраженным антикоагулянтным эффектом и неактивного фукоидана из *C. okamuranus*, проявлявшего структурное сходство с *L. saccharina*.

Ветвление. Нелинейность в фукоиданах, т.е. наличие боковых структурных элементов, как фармакофорная характеристика может быть использована при скрининге молекул-кандидатов. Так, М.-J. Clément и соавт. показали, что нелинейные олигосахариды фукоиданов проявили более выраженные антикомплементарные свойства — ветви определяют более ригидное конформационное состояние, ответственное за образование комплекса с C4 [58]. В публикации [20] показано, что именно разветвлённые фукоиданы являются прямыми ингибиторами тромбина, тогда как линейные сульфатированные фуканы требуют присутствия антитромбина (АТ) III или кофактора гепарина (КГ) II для его ингибирования.

Заряд молекулы: сульфатные и др. химические группы. В литературе есть мнение, что та или иная биологическая активность фукоиданов и сульфатированных фукоиданов реализуется благодаря их неспецифическому взаимодействию с молекулами-мишенями, сугубо обусловленному отрицательным зарядом молекулы полисахарида. Например, к таким выводам о неспецифическом действии фукоидана из *Sargassum patens* приходят в статье [59] при тестировании их антигерпетической активности. Авторы показали, что углеводный состав цепи не обязателен для полисульфатов для проявления ими противовирусной активности — даже сульфатированные соединения с С-С-остовом, такие как поливинил алкоголь сульфат, также имеют высокую противовирусную активность в отношении ВИЧ [60]. Однако некоторые авторы отмечают, что биоактивность фукоиданов может зависеть от регулярности локализации сульфатных групп в полимерной цепи углеводных остатков в большей степени, нежели от валового отрицательного заряда [61]. Иногда исследователям и вовсе не удаётся проследить выраженную связь между содержанием сульфогрупп и функциональной активностью фукоиданов [57].

Основная доля доступных литературных источников посвящена выяснению роли сульфатных групп в рассматриваемых полианионных макромолекулах в проявлении ряда биологических активностей. Приведём примеры.

Сульфогруппы играют большую роль во влиянии фукоиданов на свёртывающую и противосвёртывающую системы крови — десульфатирование может приводить к резкому снижению антикоагулянтной активности, что оказалось справедливым для фукоиданов из *L.brasiliensis* [20] и *A.nodosum* [61]. Наоборот, увеличение содержания сульфатных групп может улучшать антикоагулянтные свойства. Так, дополнительное сульфатирование нативного фукоидана из *F.vesiculosus* сокращало протромбиновое время в 4 раза по сравнению с нативным полисахаридом [62]. Сравнение аналогичных препаратов в работе [63] показало в 5 раз большую активность гиперсульфатированного препарата в реакции активации Glu-плазминогена тканевым активатором и в 1,5 раза большую активность при активации урокиназой *in vitro*. Схожая картина наблюдалась в отношении антикоагулянтных свойств у дополнительно сульфатированных препаратов фукоидана из *E.kurume* — опосредованная КГП антитромбиновая активность возрастала с увеличением содержания сульфатных групп [64]. В публикации [65] S. Soeda и соавт. показали, что в отличие от нативного и частично десульфатированного препаратов фукоидана из *F.vesiculosus*, гиперсульфатированное производное сильнее тормозило полимеризацию фибриногена, эффективнее «защищало» плазмин от $\alpha 2$ -антиплазмина и способствовало его конвертации из зимогена даже в присутствии ингибитора активатора плазминогена 1 [66]. Фрагменты гиперсульфатированного фукоидана с М.м. от 10—20, 20—40, 40—60 кДа обладали таким же супрессивным эффектом, как и первоначальный гиперсульфатированный препарат, что наводит авторов работы [66] на мысль о влиянии прежде всего сульфогрупп (нежели М.м.) на тромболитическую активность.

Сульфогруппы играют большую роль и в проявлении фукоиданами антиоксидантных свойств. Например, в публикации [34] показано, что фукоидан из *F.vesiculosus* (степень сульфатирования $\approx 44\%$) проявлял большую активность в тестах по ингибированию генерации O_2^- и $\cdot OH$ радикалов, чем полисахариды из *P.gymnospora* с меньшей степенью сульфатирования фракции F1.1 ($\approx 28\%$) и F0.5 ($\approx 18\%$).

Положительную корреляцию между содержанием сульфатов в фукоидане из *L.japonica* и его антиоксидантной активностью в отношении супероксидных радикалов выявили Wang и сотр. [67]. Однако авторы обнаружили, что полисахаридные фракции с большим содержанием суль-

фатов ($\approx 42\%$) оказались менее активными в отношении гидроксильных радикалов, чем гипосульфатированные фракции ($\approx 32\%$), и пришли к заключению, что молярное соотношение остатков фукозы и сульфатов в молекулах фукоиданов может считаться более надёжным индикатором их антиоксидантной активности. С другой стороны, имеется сообщение, что антиоксидантная активность коррелирует с содержанием полифенолов в образце фукоидана [68].

Рядом исследований показана определяющая роль сульфатов в проявлении антипаразитарных свойств фукоиданов. Так, Н. Maruyama и сотр. сообщают [69], что нативный (но не десульфатированный) фукоидан из *U.pinnatifida* ингибировал адгезию *Cryptosporidium parvum* к энтероцитам человека линии 407. Нативный фукоидан также снижал адгезию ооцист к клеткам кишечного эпителия новорожденных мышей. Ying и соавт. показали, что нативный фукоидан из *F.vesiculosus* дозозависимо ингибировал развитие *Plasmodium berghei* в клетках линии HepG2 на 84%, а также инвазию спорозоитов в клетки линии СНО на 80%. Десульфатирование фукоидана привело к потере противомаларийных свойств [70].

Противовирусная активность фукоиданов также зависит от содержания сульфогрупп в молекуле. Например, показано, что ингибирующая концентрация фукоидан-содержащей фракции из *C.indica* в отношении ВПГ-1, -2 после десульфатирования возросла в ≈ 5 раз [45], что согласуется с работой [71], где показано, что способность десульфатированных образцов фукоидан-содержащей фракции из *Stoechospermum marginatum* ингибировать образование бляшек в культуре Vero при воздействии ВПГ-1, -2 уменьшилась в 16—64 раз.

Некоторые работы посвящены изучению влияния сульфатных групп в молекуле фукоиданов на их ангиотропное действие. Soeda и сотр. отметили [72], что в отличие от нативного фукоидана из *F.vesiculosus* (содержание сульфатов $\approx 30\%$) и его дополнительно сульфатированного производного ($\approx 52\%$), которые ингибировали миграцию эндотелиоцитов пуповинной вены человека на 49 и 68%, соответственно, десульфатированный препарат ($\approx 5\%$) оказался неактивным. По сравнению с нативным фукоиданом из *F.vesiculosus* его дополнительно сульфатированный образец обладал более выраженным ингибирующим эффектом в отношении митогенного и хемотаксического действия VEGF-165 [73].

Повышение степени сульфатирования фукоиданов отражается на способности фукоиданов индуцировать пролиферацию. Известно, например, что фукоидан из *S.okamuranus* (содержание сульфатов $\approx 14\%$) обладает слабой антипролиферативной активностью в отношении клеток линии U937. Однако увеличение степени сульфати-

рования полисахарида до $\approx 33\%$ обеспечивало выраженное дозозависимое снижение пролиферации клеток и индукцию апоптоза, с вовлечением в процесс гибели клеток каспазы 3 и 7 [74].

Важную роль сульфогруппы играют и в противоопухолевой активности фукоиданов. Например, известно [75], что дополнительно сульфатированный фукоидан (содержание сульфатов $\approx 55\%$) из *L.japonica* проявил большую антипролиферативную активность, чем нативный фукоидан ($\approx 24\%$) и его десульфатированный образец (0,2%): с уменьшением содержания сульфатов снижалась способность этих биополимеров ингибировать рост клеток аденокарциномы линии MCF-7. Снижение степени сульфатирования фукоидана из *A.Nodosum* с 27 до $\approx 13\%$ приводило к резкому снижению ингибирующей активности (с 100 до 12%) в отношении роста фибробластов линии CCL39 [76]. Другим примером может послужить сообщение [77], где продемонстрировано, что нативный фукоидан (содержание сульфатов $\approx 31\%$) из *F.vesiculosus* снижал адгезию 3LL клеток мышины легочной карциномы Льюиса к ламинину, тогда как его сульфатированный аналог ($\approx 52\%$) был активнее.

Интересно отметить, что антитуморогенное действие у фукоиданов может проявляться и благодаря антиангиогенным свойствам. Так, например, в работе [73] показано, что фукоидан из *F.vesiculosus* обнаруживает антиангиогенное действие при ингибировании формирования сосудов, индуцированного клетками саркомы 180, лёгочной карциномы Льюиса и меланомы B16 у мышей, причём увеличение числа сульфатных групп усиливает этот эффект.

С другой стороны, известны работы, указывающие на то, что сульфатные группы необходимы, но отнюдь не достаточны, например, для проявления антикомплементарной [56] активности фукоиданов. А по мнению C. Boisson-Vidal и сотр. именно регулярность сульфатирования молекулы фукоидана из *A.nodosum* ответственна за антитромботическую активность этого полисахарида [61]. В то же время установить роль сульфогрупп порой и вовсе не удаётся. Так, в работе [57] авторы не нашли связи между антикоагулянтной активностью фукоиданов и содержанием сульфатов.

В контексте изучения влияния сульфогрупп на биологическую активность фукоиданов необходимо иметь ввиду, что процесс десульфатирования молекулы приводит не только к снижению суммарного отрицательного заряда, но также и к неизбежному снижению её молекулярной массы и изменению конформации. Поэтому строгих выводов о влиянии сугубо сульфатных групп сделать нельзя.

Некоторые исследователи выясняли влияние других искусственно введённых химических групп в молекулу фукоиданов на их биологичес-

кую активность, что может также представлять определённый интерес.

Так, J. Wang и соавт. в работе [78] показали, что ацетилованный и бензоилированный образцы фукоидана из *L.japonica* проявляют высокую антиоксидантную активность, обусловленную, однако, различными механизмами действия: бензоилированный препарат фукоидана обладал большей активностью в отношении супероксидных и гидроксильных радикалов, тогда как ацетилованный — в отношении гидроксильных и 2,2-дифенил-1-пикрилгидразильных радикалов. Активность аминированного производного в отношении O_2^- радикалов была выше, чем у нативного полисахарида.

Soeda и соавт. в работе [79] обнаружили, что аминированный препарат фукоидана из *F.vesiculosus* стимулировал миграцию клеток линии 3LL через Matrigel™, однако нативный ингибировал её, но при этом оба полисахарида ингибировали адгезию 3LL клеток к ламинину. Стоит отметить, что содержание сульфатов в обоих препаратах составляло $\approx 30\%$.

Влияние ацетильных групп рассматривали Е. Лапикова и соавт. в статье [80], где показали, что деацетилирование не изменило способность фукоидана из *F.evanescens* ингибировать тромбин и фактор Ха. В работе [62] была сделана попытка проследить влияние фосфатных групп в молекуле фукоидана из *F.vesiculosus*: в тесте двойного протромбинового времени фракция фукоиданов с М.м. >300 кДа (содержание фосфатов $\approx 14\%$) была в 9 раз активнее, чем полисахариды фракции <100 кДа ($\approx 46\%$).

Конформация. Интересным примером, который наглядно демонстрирует влияние конформации молекулы фуканов на проявление их биологической активности, может послужить статья [81] в которой С. F. Becker и сотр. показали, что пиранозные кольца α -L-фукана, состоящего из ($\rightarrow 3$ - α -L-Fucp-2(OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$)-мономеров, находятся преимущественно в C-1(4)-конформации, а аналогичный β -L-галактан, представленный ($\rightarrow 3$ - α -L-Galp-2(OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$)-блоками, в водном растворе имеет схожую конформацию с фуканом, но противоположную с ним ориентацию. Авторы заключают, что это объясняет наличие потенцирования ингибирования тромбина АТIII у галактана, но не у фукана — фуканы преимущественно взаимодействуют с КГП.

Молекулярная масса. Получение фукоиданов различной М.м. также даёт возможность проследить влияние на и их биологическую активность [82]. Изрядное количество публикаций посвящено выяснению роли структуры молекулы фукоиданов на систему свёртывания крови. Так, например, J. Dürig и соавт. сообщают, что увеличение М.м. способствует проагрегантным свойствам

фукоидана из *F. vesiculosus* [83]. Так, фракции 150 и 50 кДа дозозависимо индуцировали необратимую агрегацию тромбоцитов. Однако действие высокомолекулярной фракции было гораздо выраженнее, что подтверждалось данными проточной цитометрии: эта фракция увеличивала число CD62P+ и CD63+ тромбоцитов сильнее, чем низкомолекулярная. Известно также, что присутствие деполимеризованного фукоидана из *F. evanescens* может повышать антитромбинную активность КГП [80]. Другой пример — нативный фукоидан (320 кДа) из *Lessonia vadosa* проявлял выраженную антикоагулянтную активность, в то время как его деполимеризованный фрагмент (32 кДа) потерял её практически полностью [84].

Другая группа исследователей в работе [85] показала, что нативный (120 кДа) препарат фукоидана из *L. japonica* обладал проагрегантными свойствами, тогда как фрагмент с М.м. 7 кДа оказал ингибирующий эффект на агрегацию тромбоцитов. (При этом разница в сульфатировании обоих фукоиданов была на уровне 30%.) В этой работе также сообщается, что фукоидан из *F. vesiculosus* (50 кДа) непосредственно взаимодействовал с тромбином, а низкомолекулярный препарат из *L. japonica* — с антитромбином. Влияние М.м. на антикоагулянтные свойства было показано и в отношении фукоидана из *E. kurome* [86].

Роль размера молекулы в реализации антиприонных свойств фукоиданов выясняли К. Dohi и соавт. в работе [33], продемонстрировавшие профилактическое действие перорально назначаемого фукоидана из *S. okamuranus* в отношении скрейпи у энтерально инфицированных мышей. В тестах *in vitro*, препарат с М.м. ≈ 140 кДа ингибировал формирование новых прионных частиц в инфицированных клетках нейробластомы сильнее, чем полисахарид с М.м. ≈ 43 кДа.

Влияние молекулярной массы фукоиданов на их противоопухолевую активность оценивали С. Yang и соавт. [45], которые установили, что цитотоксическая активность нативного (5100 кДа) фукоидана из *U. pinnatifida* в отношении клеток эпителиальной карциномы лёгких линии A549 оценивалась в ≈ 15 –38%, тогда как для фукоиданов с М.м. 2200 кДа — $\approx 71\%$. Небольшой прирост противоопухолевой активности ($\approx 80\%$) был у полисахаридов с М.м. 490 кДа, что может быть связано, как отмечают исследователи, с большей молярной концентрацией вещества и растворимостью препарата. У фукоиданов с М.м. 260 кДа активность снижалась до $\approx 62\%$, что, возможно, стало следствием частичного десульфатирования, как это сообщалось и в отношении сульфатированного фукуана из *S. pallidus* [87].

Влияние М.м. также отражается на антикомplementарных свойствах фукоиданов. Так, Blondin и соавт. показали, что фрагменты фукоидана из

A. nodosum с М.м. от 4,1 до 214 кДа обладают разной способностью блокировать комплемент-опосредованный лизис эритроцитов барана (классический путь) и кролика (альтернативный путь), увеличивающийся с повышением М.м. и достигающий максимума для фукоидана в 40 кДа для классического пути и фукоидана 135 кДа для альтернативного [56]. Авторы работы [88] установили, что назначение *per os* фукоидана ≈ 100 кДа из *U. pinnatifida* в значительной степени усиливало тяжесть коллаген-индуцированного артрита у мышей линии DBA/1J, тогда как «осколки» биополимера (≈ 1 кДа) — уменьшали. К резкому ухудшению антикоагулянтных и антитромботических свойств приводила деполимеризация фукоиданов из *A. nodosum* [61].

Заключение

Фукоиданы — биологически активные полимеры бурых водорослей известны своим широким спектром фармакофорных свойств. Однако уровень изученности фукоиданов позволяет получить лишь общее представление об их структуре, поэтому получение знаний о роли конкретных элементов архитектуры в проявлении тех или иных биологических свойств фукоиданов остаётся актуальной задачей. В этом обзоре мы обозначили существующие направления исследований биологической активности фукоиданов бурых водорослей в контексте особенностей строения их молекул. Рассмотренные примеры позволяют удостовериться в значительной роли суммарного отрицательного заряда и его плотности, сообщаемого сульфатными группами, которые, предположительно ответственны за неспецифическое действие этих полисахаридов. Также были приведены свидетельства и в пользу других как нативных, так и искусственно привнесённых — структурных элементов, которые могут влиять на функциональную активность данных биогликанов. Принимая во внимание данные таких исследований, роль сульфогрупп является уже не столь однозначной.

Несмотря на значительные усилия исследователей эти биогликаны остаются полисахаридами, для которых структурный анализ является чрезвычайно сложным, в связи с чем надёжных корреляций между химической структурой и биологической активностью установить трудно. Однако результаты экспериментальных работ, продемонстрировавшие на примере гомофукуанов возможность добиться диссоциации побочного антикоагулянтного эффекта, повышающего риск кровотечений, от необходимых противовоспалительных [57] и антитромботических свойств [4], позволяют надеяться, что подобных успехов можно ожидать и в плане фукоиданов. Отметим также, что идентифицировать конкретные элементы структуры молекул фукоиданов важно, так как

имеющиеся сообщения, например, об усугублении фукоиданами ишемического повреждения ткани при острой почечной недостаточности [89], а также о формировании внутрисосудистых гранулоцитарных агрегатов [90] в моделях *in vivo*,

заставляет признать, что данные биогликаны всё же обладают побочными эффектами, которые, возможно, могут быть устранены, благодаря детальному знанию о связях структуры и функции данных биогликанов.

ЛИТЕРАТУРА

- Berteau O., Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 2003; 13: 6: 29R–40R.
- Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydr Res* 2002; 337: 8: 719–730.
- Doh-ura K., Kuge T., Uomoto M., Nishizawa K., Kawasaki Y., Iha M. Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteral prion infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 6: 2274–2277.
- Mourzo P.A.S. Use of Sulfated Fucans as Anticoagulant and Antithrombotic Agents: Future Perspectives. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 967–981.
- Mandal P., Mateu C.G., Chattopadhyay K., Pujol C.A., Damonte E.B., Ray B. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antivir Chem Chemother* 2007; 18: 3: 153–162.
- Bilan M.I., Usov A.I. Structural analysis of fucoidans. *Natural Product Communication* 2008; 3: 10: 1639–1648.
- Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L., Gorbach V.I., Urvantseva A.M., Kiseleva M.I. et al. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far-East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans. *J Exp Mar Biol Ecol* 2005; 320: 2: 123–131.
- Билан М.И., Клочкова Н.Г., Шапков А.С., Усов А.И. Полисахариды тихоокеанской бурой водоросли *Alaria marginata*. Изв АН Сер хим 2018; 54: 1: 137–43. / Bilan M.I., Klochkova N.G., Shashkov A.S., Usov A.I. Polisaharidy tihookeanskoj buroj vodorosli *Alaria marginata*. Izv AN Ser him 2018; 54: 1: 137–143. [In Russian]
- Vasseur E. Chemical studies on the jelly coat of the sea-urchin egg. *Acta Chem Scand* 1948; 2: 900–913.
- Mourzo P.A.S. A Carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 5–17.
- Bisgrove S.R., Kropf D.L. Cell wall deposition during morphogenesis in fucoid algae. *Planta* 2001; 212: 5: 648–658.
- Mabeau S., Kloareg B., Joseleau J.-P. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry* 1990; 29: 8: 2441–2445.
- Aquino R.S., Grattivo C., Mourzo P.A.S. Rising from the Sea: Correlations between Sulfated Polysaccharides and Salinity in Plants. *PLoS One* 2011; 6: 4: e18862.
- Harvey D.J. Quantitative aspects of the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1993; 7: 7: 614–619.
- Kusaykin M., Bakunina I., Sova V., Ermakova S., Kuznetsova T., Besednova N. et al. Structure, biological activity, and enzymatic of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnol J* 2008; 3: 904–915.
- Daniel R., Chevotot L., Carrascal M., Tissot B., Mourao P.A., Abian J. Electrospray ionization mass spectrometry of oligosaccharides derived from fucoidan of *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr Res* 2007; 342: 6: 826–834.
- Ciancia M., Sato Y., Nonami H., Cerezo A.S., Erra-Balsells R., Matulewicz M.C. Autohydrolysis of a partially cyclized mu/nu-carageenan and structural elucidation of the oligosaccharides by chemical analysis, NMR spectroscopy and UV-MALDI mass spectrometry. *ARKIVOC* 2005(Pt 12): 319–331.
- Шевченко Н.М., Анастасюк С.Д., Герасименко Н.И., Дмитренко П.С., Исаков В.В., Звягинцева Т.Н. Полисахаридный и липидный состав бурой водоросли *Laminaria gurjanovae*. Биоорган хим. — 2007. — Т. 33. — № 1. С. 96–107. / Shevchenko N.M., Anastjuk S.D., Gerasimenko N.I., Dmitrenok P.S., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N. Polisaharidnyj i lipidnyj sostav buroj vodorosli *Laminaria gurjanovae*. Bioorgan him 2007; 33: 1: 96–107. [In Russian]
- Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. *Carbohydr Res* 2004; 339: 3: 511–517.
- Pereira M.S., Mulloy B., Mourzo P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem* 1999; 274: 12: 7656–7667.
- Ustuzhanina N.E., Krylov V.B., Usov A.I., Nifantiev N.E. Synthesis of fucoidan fragments. В кн.: Nifantiev N.E. (ред.). Progress in the synthesis of complex carbohydrate chains of plant and microbial polysaccharides. Kerala: Transworld Research Network, 2009; 131–154.
- Kusaykin M., Chizhov A., Grachev A., Alekseeva S., Bakunina I., Nedashkovskaya O. et al. A comparative study of specificity of fucoidanases from marine microorganisms and invertebrates. *J Appl Phycol* 2006; 18: 3: 369–373.
- Anastjuk S.D., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. Structural analysis of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* by MALDI-TOF and tandem ESI mass spectrometry. *Carbohydr Res* 2009; 344: 6: 779–787.
- Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydr Res* 2006; 341: 2: 238–245.
- Preeprame S., Hayashi K., Lee J.B., Sankawa U., Hayashi T. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001; 49: 4: 484–485.
- Li B., Wei X.-J., Sun J.-L., Xu S.-Y. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr Res* 2006; 341: 9: 1135–1146.
- Билан М.И., Захарова А.Н., Грачев А.А., Шапков А.С., Нифантьев Н.Э., Усов А.И. Полисахариды водорослей. 60. Фукоидан из тихоокеанской бурой водоросли *Analipus japonicus* (Harv.) Winne (*Ectocarpales*, *Scytosiphonaceae*). Биоорган хим. — 2007. — Т. 33. — № 1. — С. 44–53. / Bilan M.I., Zaharova A.N., Grachjov A.A., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Usov A.I. Polisaharidy vodoroslej. 60. Fukoidan iz tihookeanskoj buroj vodorosli *Analipus japonicus* (Harv.) Winne (*Ectocarpales*, *Scytosiphonaceae*). Bioorgan him 2007; 33: 1: 44–53. [In Russian]
- Hoshino T., Hayashi T., Hayashi K., Hamada J., Lee J.-B., Sankawa U. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. *Biol Pharm Bull* 1998; 21: 7: 730–734.
- Yang C., Chung D., You S. Determination of physicochemical properties of sulphated fucans from sporophyll of *Undaria pinnatifida* using light scattering technique. *Food Chem* 2008; 111: 2: 503–507.
- Usov A.I., Smirnova G.P., Bilan M.I., Shashkov A.S. Polysaccharides of algae. 53. Brown algae *Laminaria saccharina* (L.) Lam. as a source of fucoidan. *Russ J Bioorgan Chem* 1998; 24: 437–445.
- Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 2007; 17: 5: 541–552.
- Hmelkov A.B., Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Rasin A.B., Ermakova S.P. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from brown alga *Fucus evanescens*. Structure and biological activity of the new fucoidan fractions. *J Appl Phycol* 2017.
- Rioux L.E., Turgeon S.L., Beaulieu M. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydr Polym* 2007; 69: 3: 530–537.
- Rocha de Souza M.C., Marques C.T., Guerra Dore C.M., Ferreira da Silva F.R., Oliveira Rocha H.A., Leite E.L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phycol* 2007; 19: 2: 153–160.
- Chevotot L., Mulloy B., Ratiskol J., Foucault A., Collic-Jouault S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidan from two species of brown algae. *Carbohydr Res* 2001; 330: 4: 529–535.
- Nagaoka M., Shibata H., Takagi K.I., Hashimoto S., Kimura K., Makino T. et al. Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* Tokida. *Glycoconj J* 1999; 45: 325–336.
- Sakai T., Ishizuka K., Shimanaka K., Ikai K., Kato I. Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes. *Mar Biotechnol* 2003; 5: 536–544.
- Anastjuk S.D., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L., Imbs T.I., Gorbach V.I., Dmitrenok P.S. et al. Structural analysis of a highly sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* by tandem MALDI and ESI mass spectrometry. *Carbohydr Res* 2010; 345: 15: 2206–2212.
- Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S. et al. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res* 1999; 320: 1–2: 108–119.
- Mulloy B. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *An Acad Bras Cienc* 2005; 77: 4: 651–664.

41. Honya M., Mori H., Anzai M., Araki Y., Nisizawa K. Monthly changes in the content of fucans, their constituent sugars and sulphate in cultured *Laminaria japonica*. *Hydrobiologia* 1999; 398/399: 411–416.
42. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O., Krupnova T.N., Sundukova E.V., Isakov V.V. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 2003; 294: 1–13.
43. Kimura T., Ueda K., Kuroda R., Akao T., Shinohara N., Ushirokawa T. et al. The seasonal variation in polysaccharide content of brown alga *akamoku Sargassum horneri* collected off Oshima Island (Fukuoka Prefecture). *Nippon Suisan Gakkaishi* 2007; 73: 4: 739–744.
44. Obluchinskaya E. Comparative chemical composition of the Barents Sea brown algae. *Appl Biochem Microbiol* 2008; 44: 3: 305–309.
45. Yang C., Chung D., Shin I.-S., Lee H., Kim J., Lee Y. et al. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Int J Biol Macromol* 2008; 43: 5: 433–437.
46. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L., Stortz C.A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr Res* 2003; 338: 2: 153–165.
47. Rupřez P., Ahrazem O., Leal J.A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 4: 840–845.
48. Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю., Исаков В.В., Глазунов В.П., Звягинцева Т.Н. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика. *Хим раст сырья*. – 2004. – С. 15–24. / Urvanceva A.M., Bakunina I.Ju., Kim N.Ju., Isakov V.V., Glazunov V.P., Zvyagintseva T.N. Vydelenie ochishchennogo fukoidana iz prirodnogo kompleksa s polifenolami i ego harakteristika. *Him rast syr'ja* 2004; 15–24. [In Russian]
49. Запорожец Т.С., Кузнецова Т.А., Смолина Т.П., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н. Иммуноотропные и антикоагулянтные свойства фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*: перспективы применения в медицине. *Журн микробиол эпидемиол и иммунобиол.* – 2006. – № 53. – С. 54–58. / Zaporozhec T.S., Kuznecova T.A., Smolina T.P., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Besednova N.H. Immunotropnyye i antikoagulyantnyye svoystva fukoidana iz buroy vodorosli *Fucus evanescens*: perspektivy primeneniya v medicine. *Zh mikrobiol epidemiol i immunobiol* 2006; 53: 54–58. [In Russian]
50. Макаренкова И.Д., Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Звягинцева Т.Н., Имбс Т.И., Ермакова С.П. et al. Противовирусная активность сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей при экспериментальном клещевом энцефалите: связь структуры и функции. *Тихоокеан мед жур.* – 2012/– № 1. – С. 44–46. / Makarenkova I.D., Leonova G.N., Majstrovskaja O.S., Zvyagintseva T.N., Imbs T.I., Ermakova S.P. i dr. Protivovirusnaja aktivnost' sul'fatirovannyh polisaharidov iz buryh vodoroslej pri jeksperimental'nom kleshhevom jencefalite: svjaz' struktury i funkci. *Tihookean medicn zhur* 2012; 1: 44–46. [In Russian]
51. Беседнова Н.Н., Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Звягинцева Т.Н. Морские бурые водоросли — источник новых фармацевтических субстанций антибактериальной направленности. *Антибиотики и химиотер.* – 2015. – Т. 60. – № 3-4. – С. 31–41. / Besednova H.H., Kuznecova T.A., Zaporozhec T.S., Zvyagintseva T.N. Morskie burye vodorosli — istochnik novyh farmacevitcheskih substancij antibakterial'noj napravlenosti. *Antibiotiki i khimioter* 2015; 60: 3–4: 31–41. [In Russian]
52. Kwak J.-Y. Fucoidan as a Marine Anticancer Agent in Preclinical Development. *Mar Drugs* 2014; 12: 2: 851.
53. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Ushakova N.A., Usov A.I., Kiselevskiy M.V., Nifantiev N.E. Fucoidans: Pro- or antiangiogenic agents? *Glycobiology* 2014; 24: 12: 1265–1274.
54. Schaeffer D.J., Krylov V.S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 2000; 45: 3: 208–227.
55. Nishino T., Yokoyama G., Dobashi K., Fujihara M., Nagumo T. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. *Carbohydr Res* 1989; 186: 1: 119–129.
56. Blondin C., Chaubet F., Nardella A., Sinquin C., Jozefonvicz J. Relationships between chemical characteristics and anticomplementary activity of fucans. *Biomaterials* 1996; 17: 6: 597–603.
57. Ushakova N., Morozovich G., Ustyuzhanina N., Bilan M., Usov A., Nifantiev N. et al. Anticoagulant activity of fucoidans from brown algae. *Biochem (Mosc) Suppl Ser B Biomed Chem* 2008; 3: 1: 77–83.
58. Climent M.-J., Tissot B., Chevotot L., Adjadj E., Du Y., Curmi P.A. et al. NMR characterization and molecular modeling of fucoidan showing the importance of oligosaccharide branching in its anticomplementary activity. *Glycobiology* 2010; 20: 7: 883–894.
59. Zhu W., Ooi V.E., Chan P.K., Ang P.O., Jr. Isolation and characterization of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* and determination of its anti-herpes activity. *Biochem Cell Biol* 2003; 81: 1: 25–33.
60. Witvrouw M., De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen Pharmacol* 1997; 29: 4: 497–511.
61. Boisson-Vidal C., Chaubet F., Chevotot L., Sinquin C., Theveniaux J., Millet J. et al. Relationship between antithrombotic activities of fucans and their structure. *Drug Dev Res* 2000; 51: 4: 216–224.
62. Dace R., McBride E., Brooks K., Gander J., Buszko M., Doctor V.M. Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides. *Thromb Res* 1997; 87: 1: 113–121.
63. Qiu X., Amarasekara A., Doctor V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. *Carbohydr Polym* 2006; 63: 2: 224–228.
64. Nishino T., Nagumo T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydr Res* 1992; 229: 2: 355–362.
65. Soeda S., Sakaguchi S., Shimeno H., Nagamatsu A. Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 8: 1853–1858.
66. Soeda S., Fujii N., Shimeno H., Nagamatsu A. Oversulfated fucoidan and heparin suppress endotoxin induction of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human endothelial cells: their possible mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1269: 1: 85–90.
67. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Song H., Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol* 2010; 46: 1: 6–12.
68. Imbs T.I., Skriptsova A.V., Zvyagintseva T.N. Antioxidant activity of fucose-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods. *J Appl Phycol* 2015; 27: 1: 545–553.
69. Maruyama H., Tanaka M., Hashimoto M., Inoue M., Sasahara T. The suppressive effect of Mekabu fucoidan on an attachment of *Cryptosporidium parvum* oocysts to the intestinal epithelial cells in neonatal mice. *Life Sci* 2007; 80: 8: 775–781.
70. Ying P., Shakibaei M., Patankar M.S., Clavijo P., Beavis R.C., Clark G.F. et al. The malaria circumsporozoite protein: interaction of the conserved regions I and II-plus with heparin-like oligosaccharides in heparan sulfate. *Exp Parasitol* 1997; 85: 2: 168–182.
71. Adhikari U., Mateu C.G., Chattopadhyay K., Pujol C.A., Damonte E.B., Ray B. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry* 2006; 67: 22: 2474–2482.
72. Soeda S., Kozako T., Iwata K., Shimeno H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1497: 1: 127–134.
73. Koyanagi S., Tanigawa N., Nakagawa H., Soeda S., Shimeno H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 2: 173–179.
74. Teruya T., Konishi T., Uechi S., Tamaki H., Tako M. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladophora okamuranus* Tokida in U937 cells. *Int J Biol Macromol* 2007; 41: 3: 221–226.
75. Park J.-S., Kim A., Kim E.-H., Suh H.-S., WonChul C. Increased anti-cancer activity by the sulfated fucoidan from Korean brown seaweeds. *Journal of the Korean Chemical Society* 2002; 46: 2: 151–156.
76. Dřrig J., Bruhn T., Zurborn K.-H., Gutensohn K., Bruhn H.D., Břress L. Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation *in vitro*. *Thromb Res* 1997; 85: 6: 479–491.
77. Soeda S., Ishida S., Shimeno H., Nagamatsu A. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on invasion through reconstituted basement membrane by murine Lewis lung carcinoma. *Cancer Sci* 1994; 85: 11: 1144–1150.
78. Wang J., Liu L., Zhang Q., Zhang Z., Qi H., Li P. Synthesized oversulfated, acetylated and benzoylated derivatives of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity *in vitro*. *Food Chem* 2009; 114: 4: 1285–1290.
79. Soeda S., Ishida S., Honda O., Shimeno H., Nagamatsu A. Aminated fucoidan promotes the invasion of 3 LL cells through reconstituted basement membrane: its possible mechanism of action. *Cancer Lett* 1994; 85: 1: 133–138.
80. Lapikova E., Drozd N., Tolstenkov A., Makarov V., Zvyagintseva T., Shevchenko N. et al. Inhibition of thrombin and factor Xa by *Fucus evanescens* fucoidan and its modified analogs. *Bull Exp Biol Med* 2008; 146: 3: 328–333.
81. Becker C.F., Guimaraes J.A., Mourzo P.A.S., Verli H. Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: Implications to their anticoagulant activities. *J Mol Graphics Model* 2007; 26: 1: 391–399.
82. Morya V., Kim J., Kim E.-K. Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93: 1: 71–82.

83. Dürig J., Bruhn T., Zurborn K.-H., Gutensohn K., Bruhn H.D., Büress L. Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation *in vitro*. *Thromb Res* 1997; 85: 6: 479—491.
84. Chandua N.P., Matsuhiro B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *Int J Biol Macromol* 2008; 42: 3: 235—240.
85. Zhu Z., Zhang Q., Chen L., Ren S., Xu P., Tang Y. et al. Higher specificity of the activity of low molecular weight fucoidan for thrombin-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 2010; 125: 5: 419—426.
86. Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H., Yamada H. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydr Res* 1991; 211: 1: 77—90.
87. Pomin V.H., Valente A.P., Pereira M.S., Mourzo P.A.S. Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: a selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides. *Glycobiology* 2005; 15: 12: 1376—1385.
88. Park S.-B., Chun K.-R., Kim J.-K., Suk K., Jung Y.-M., Lee W.-H. The differential effect of high and low molecular weight fucoidans on the severity of collagen-induced arthritis in mice. *Phytother Res* 2010; 24: 9: 1384—1391.
89. Goor Y., Goor O., Wollman Y., Chernichovski T., Schwartz D., Cabili S. et al. Fucoidin, an inhibitor of leukocyte adhesion, exacerbates acute ischemic renal failure and stimulates nitric oxide synthesis. *Scand J Urol Nephrol* 2006; 40: 57—62.
90. Dittrich S., Lippek F., Gratopp A., Grosse-Siestrup C., Lange P.E., Bührer C. Intravascular granulocyte aggregates caused by the selectin-binding carbohydrate fucoidin in pig kidneys. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 10: 909—914.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хильченко Станислав Русланович — научный сотрудник Любекский институт экспериментальной дерматологии, Любек, Германия

Запорожец Татьяна Станиславовна — д. м. н., заместитель директора по научной работе, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова), Владивосток

Звягинцева Татьяна Николаевна — д. х. н., профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии

им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН), Владивосток

Шевченко Наталья Михайловна — к. х. н., старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН), Владивосток

Беседнова Наталия Николаевна — д. м. н., академик РАН, главный научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова), Владивосток

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

Редакция обращает внимание авторов на следующие правила и форму представления рукописей для публикации в журнале «Антибиотики и химиотерапия».

1. Рукописи статей в 2 экз. (вместе с электронной версией текста на диске) с приложением в 2 экз. иллюстраций (в отдельном конверте) направляются по адресу: **113105 Москва, ул. Нагатинская, д. 3а. Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия».** Рукопись должна иметь сопроводительное письмо, подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа. Статья подписывается всеми авторами **с указанием ответственного за переписку (Ф.И.О., адрес, телефон).**

2. В выходных данных статьи указываются: название, инициалы, фамилии авторов, наименование учреждений, всех авторов, их должности, e-mail.

3. Статья печатается на одной стороне стандартного листа **через 1,5–2 интервала при ширине полей слева 3 см.**

4. Объём оригинальной статьи (как правило) не должен превышать 12 страниц, включая таблицы и иллюстрации, общее количество иллюстраций — не более 5. Объём обзорной статьи не должен превышать 20 страниц, а список цитируемой литературы — не более 60 названий. Объём заказанных статей устанавливается по договоренности.

5. Оригинальная статья должна включать (по порядку) следующие основные разделы: **«Резюме»** — не более 1 страницы; введение с кратким обзором литературы и постановкой цели исследования; **«Материал и методы»** — с детальным описанием объектов исследований, методических приёмов и квалификаций использованных реагентов (фирм-изготовителей); **«Результаты исследований»** и **«Обсуждение результатов»** или **«Результаты и обсуждение»**, **«Заключение»** или **«Выводы»** (по пунктам); **«Литература»** — с указанием цитируемых источников.

6. Таблицы должны быть пронумерованы, **иметь название**, заголовки граф точно соответствовать их содержанию, а цифры в таблицах — цифрам в тексте. Необщепринятые сокращения в графах не допускаются. На каждую таблицу в тексте статьи должны быть **сноски.**

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. На обороте каждого рисунка указывается фамилия первого автора статьи, номер рисунка, обозначается верх рисунка. В тексте статьи обязательны ссылки на рисунок. Рисунки и таблицы не должны дублировать друг друга. **Подписи к рисункам делаются на отдельном листе** с указанием номера рисунка и его названия. Для графиков и диаграмм отмечается, **что дано по осям координат** на приведенных кривых и т. п.

8. В формулах должны быть чётко **размечены все элементы:** строчные (м) и прописные (М) буквы, синим подчеркнуты латинские буквы, красным — греческие (с вынесением разметки на поля), четко выделяются подстрочные и надстрочные индексы; в случае цифр и букв, сходных по написанию (0 — цифра, О — буква), должны быть сделаны соответствующие пометки.

9. **Сокращения слов, названий** (кроме общепринятых сокращений мер физических, химических, а также математических величин и терминов) **не допускаются.** Меры даются по Международной системе единиц (**СИ**) в русском обозначении, температура по шкале Цельсия.

10. Латинские названия микроорганизмов приводятся в соответствии с современной классификацией. При первом упоминании название микроорганизма дается полностью — род и вид (например, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces lividans*), при повторном упоминании **родовое название сокращается** до одной буквы (*E.coli*, *S.aureus*, *S.lividans*).

11. Названия генетических элементов даются в трёхбуквенном обозначении латинского алфавита строчными буквами, курсивом (*tet*), кодируемыми соответствующими генетическими элементами продукты — прописными прямыми буквами (ТЕТ).

12. В журнале используются **международные непатентованные названия** (МНН) препаратов. Торговые (патентованные) названия, под которыми препараты выпускаются различными фирмами, приводятся в разделе «Материал и методы», с указанием фирмы-изготовителя и их международным непатентованным названием.

13. Цитируемые источники литературы во всех видах публикаций нумеруются в порядке их упоминания в тексте и заключаются в квадратные скобки. В библиографическом описании указываются фамилия, инициалы автора, название статьи, журнала, год, том, номер журнала, номера страниц «от» и «до»; в случае монографии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, год, количество страниц.

14. Статьи, ранее опубликованные или направленные в какой-либо другой журнал или сборник, не должны присылаться.

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

16. Статьи, принятые в журнал, проходят рецензирование. Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

**УДОБНО
ДЛЯ ВРАЧЕЙ!**



Универсальный противовирусный препарат

- широкий спектр действия
- высокий профиль безопасности
- прямое противовирусное действие
- индукция эндогенного интерферона
- большой опыт применения



Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой 150 мг, N 10, 20, 50.
P No01049/02 от 12.12.2007 раствор для в/в и в/м введения 125 мг/мл, 5 ампул по 2 мл.
P No01049/03 от 28.08.2007 линимент 5%, 5 мл, 30 мл P No01049/01 от 05.03.2010.

ООО «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФИРМА «ПОЛИСАН»
INFO@POLYSAN.RU WWW.POLYSAN.RU

РОССИЯ, 192102, Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ,
УЛ. САЛОВА, Д. 72, КОР. 2, ЛИТ. А,
ТЕЛ./ФАКС: +7 (812) 710-82-25

 Интеллект на защите
здоровья
polysan