

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 60



3-4'2015

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»
Published 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

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 2015

Типография:

ООО «Новелла»

Дата выхода: 15.06.2015

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 60

3—4'2015

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

Член-корр РАМН, проф., д. м. н. Белоусов Ю. Б.
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.
Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.
Проф., д. м. н. Никитин А. В.
Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.
Проф. Руднов В. А.
Проф. Тишков В. Н.
Проф., д. б. н. Фирсов А. А.
Проф., д. м. н. Яковлев С. В.
Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Оригинальные статьи

Смирнова И. П., Ларичев В. Ф., Шнейдер Ю. А.
Исследование активности L-лизин- α -оксидазы в опытах *in vitro* на моделях вирусов Синдбис, клещевого энцефалита, Западного Нила, Тягиня и Дхори
Бруслик Н. Л., Ахатова Д. Р., Тойменцева А. А., Абдулхаков С. Р., Ильинская О. Н., Яруллина Д. Р.
Оценка лекарственной устойчивости пробиотических лактобацилл
Гулий О. И., Бунин В. Д., Ларионова О. С., Потемкина Е. Г., Игнатов О. В.
Определения чувствительности микробных клеток к сульфаниламидным препаратам методом электрооптического анализа

В помощь практикующему врачу

Расулов М. М., Моторина И. Г., Юшков Г. Г., Дроздова О. М., Корсакова Н. В.
Устойчивость к антибиотикам микроорганизмов, взятых из длительно незаживающих ран и облучённых светом различных длин волн
Стельмах В. В., Козлов В. К., Некрасова А. Н.
Кинетика вирусной нагрузки HCV-RNA в сыворотке крови и периферических мононуклеарных клетках при применении безинтерфероновой схемы терапии (Циклоферон + Рибавирин) у пациента с циррозом печени в исходе хронического вирусного гепатита С

Обзоры

Беседнова Н. Н., Кузнецова Т. А., Запорожец Т. С., Звягинцева Т. Н.
Морские бурые водоросли — источник новых фармацевтических субстанций антибактериальной направленности
Богущ Т. А., Попова А. С., Дудко Е. А., Богущ Е. А., Тюляндина А. С., Тюляндин С. А., Давыдов М. И.
ERCC1 как маркер резистентности рака яичников к препаратам платины

Original Papers

- 3 Smirnova I. P., Larichev V. F., Shneider Yu. A.
L-Lysine- α -Oxidase *in vitro* Activity in Experiments on Models of Viruses Sindbis, Forest-Spring Encephalitis, Western Nile, Tyaginya and Dhori
- 6 Bruslik N. L., Akhatova D. R., Toimentseva A. A., Abdulkhakov S. R., Ilyinskaya O. N., Yarullina D. R.
Estimation of Probiotic Lactobacilli Drug Resistance
- 14 Guliy O. I., Bunin V. D., Larionova O. S., Potemkina E. G., Ignatov O. V.
Determination of Microbial Susceptibility to Sulfanilamides by Electrooptic Analysis

Guidelines For Practitioners

- 20 Rasulov M. M., Motorina I. G., Yushkov G. G., Drozdova O. M., Korsakova N. V.
Antibiotic Resistance of Microbial Isolates from Long-Term Healing Wounds Exposed to Light of Various Wave Lengths
- 24 Stelmah V. C., Kozlov V. K., Nekrasova A. N.
Kinetics of Virus Load HCV-RNA in Blood Serum and Peripheral Mononuclear Cells in a Patient with Hepatocirrhosis and Chronic Virus Hepatitis C Termination Treated According to Noninterferon Treatment Scheme (Cycloferon + Ribavirin)

Reviews

- 31 Besednova N. N., Kuznetsova T. A., Zaporozhets T. S., Zvyagintseva T. N.
Brown Seaweeds as a Source of New Pharmaceutical Substances with Antibacterial Action
- 42 Bogush T. A., Popova A. S., Dudko E. A., Bogush E. A., Tyulyandina A. S., Tyulyandin S. A., Davydov M. I.
ERCC1 as a Marker of Ovarian Cancer Resistance to Platinum Drugs

По страницам журналов 51 Abstracts

* 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.

Исследование активности L-лизин- α -оксидазы в опытах *in vitro* на моделях вирусов Синдбис, клещевого энцефалита, Западного Нила, Тягиня и Дхори

И. П. СМЕРНОВА¹, В. Ф. ЛАРИЧЕВ², Ю. А. ШНЕЙДЕР¹

¹ Российский университет дружбы народов, Москва

² Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва
Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздрава России, Москва

L-Lysine- α -Oxidase *in vitro* Activity in Experiments on Models of Viruses Sindbis, Forest-Spring Encephalitis, Western Nile, Tyaginya and Dhori

I. P. SMIRNOVA, V. F. LARICHEV, YU. A. SHNEIDER

Russian University of Peoples' Friendship, Moscow

N. F. Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow

Впервые исследовалось влияние противоопухолевой препарата L-лизин- α -оксидазы, полученного из культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F-180. В опытах *in vitro* установлена высокая активность L-лизин- α -оксидазы на модели вируса клещевого энцефалита и отсутствие активности в отношении вирусов Синдбис, Западного Нила, Тягиня и Дхори.

Ключевые слова: L-лизин- α -оксидаза, арбовирусы, клещевой энцефалит, цитопатическое действие, противовирусная активность.

The antitumor effect of L-lysine- α -oxidase from the culture fluid of *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 was investigated for the first time. The *in vitro* studies revealed its high activity on a model of the forest-spring encephalitis virus and no activity against the Sindbis, Western Nile, Tyaginya and Dhori viruses.

Key words: L-lysine- α -oxidase, arboviruses, forest-spring encephalitis, cytopathic effect, antiviral activity.

Арбовирусы — это экологическая группа вирусов, передающихся восприимчивым позвоночным через укусы кровососущих членистоногих: комаров, клещей, москитов, мошек и мокрецов.

Такие инфекции, как лихорадка Чикунгунья и О'Ньонг-Ньонг, восточный, западный, венесуэльский энцефалиты лошадей (сем. *Togaviridae*), лихорадка денге, жёлтая лихорадка, энцефалиты — японский, клещевой, Сент-Луис, долины Муррея, Западного Нила (сем. *Flaviviridae*), Крымской-Конго геморрагической лихорадки, лихорадки Долины Рифт (сем. *Bunyaviridae*), а также вирусы других семейств (*Reoviridae*, *Arenaviridae* и *Rhabdoviridae*) — далеко не полный перечень опасных для человека арбовирусных инфекций, имеющих огромное значение для здравоохранения.

Для подавляющего большинства арбовирусных инфекций вакцинные препараты не разработаны. В связи с этим химиопрепараты приобрета-

ют решающее значение как для лечения, так и для профилактики.

В основу изучения противовирусного действия препаратов положен таксономический принцип (если препарат действует на один «модельный» вирус, то можно предположить, что он будет действовать на все вирусы данного семейства, так как стратегия генома у всего семейства одинакова).

Большая часть исследований, касающаяся химиотерапии арбовирусных инфекций, посвящена изучению ингибирующей роли антивирусных препаратов на моделях бунья- и аренавирусных инфекций. Весьма обнадеживающими были данные о выраженной противовирусной активности рибавирина в отношении тога-, бунья- и аренавирусных инфекций и о перспективности этого препарата для клинического применения [1].

На кафедре биохимии им. академика Т. Т. Берёзова Российского университета дружбы народов в течение многих лет проводятся исследования L-лизин- α -оксидазы — антивирусного и противоопухолевого фермента из *Trichoderma harzianum* Rifai F-180. Фермент

© Коллектив авторов, 2015

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

Схема эксперимента Определение активности L-лизин- α -оксидазы на перевиваемых линиях клеток

Ряды	L-лизин- α -оксидаза, 25 мкг/мл				L-лизин- α -оксидаза 12,5 мкг/мл				Поддерживающая среда без L-лизин- α -оксидазы			
	1**	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
*A	-2***	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
B	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
C	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4
D	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5
E	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
F	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7	-7
G	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8	-8
H	Контроль токсичности				Контроль токсичности				Контроль клеток			

Примечание. * — Номера горизонтальных рядов на 96-луночном планшете; ** — номера вертикальных рядов на 96-луночном планшете; *** — степень (10^{-2} , 10^{-3} ...) разведения исследуемого вируса.

L-лизин- α -оксидаза является ингибитором вируса простого герпеса 1-го типа, вируса иммунодефицита человека и ряда других особо опасных вирусов [2—10].

Цель данной работы — исследование возможности ингибирования гомогенного фермента L-лизин- α -оксидазой вирусов из семейств *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* и *Orthomyxoviridae*.

Материал и методы

В работе использованы вирусы из коллекции лаборатории биологии и индикации арбовирусов «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского»: семейство *Togaviridae*, род *Alfavirus* — вирус Синдбис (штамм 574); семейство *Flaviviridae*, род *Flavivirus* — вирус клещевого энцефалита (штамм 205), вирус Западного Нила (штамм Аст.986); семейство *Bunyaviridae*, род *Bunyavirus* — вирус Тягиня (штамм 92); семейство *Orthomyxoviridae*, род *Thogotovirus* — вирус Дхори (прототипный штамм).

Перевиваемые линии клеток: клетки почки эмбриона свиньи (SPEV) и клетки почки эмбриона зелёной мартышки (Vero, клон E6). Клетки SPEV выращивали в 96-луночных планшетах («Corning», США) на питательной среде 199 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН) с 5% эмбриональной телячьей сыворотки («High Clone», США). Клетки Vero E6 выращивали в 96-луночных планшетах на питательной среде Игла с двойным набором аминокислот (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН) с 5% эмбриональной телячьей сыворотки («High Clone», США).

Источником заражения клеток служили вирусосодержащие суспензии мозговой ткани инфицированных новорождённых белых мышей. Для приготовления разведений мозговой ткани и препаратов использовалась питательная среда с 1% эмбриональной телячьей сывороткой («High Clone», США). Готовили 10% мозговую суспензию, а затем — последовательные десятикратные разведения вирусосодержащего материала от 10^{-2} до 10^{-10} .

Учёт реакций проводили ежедневно в течение 7 дней, наблюдая за развитием цитопатического действия (ЦПД) (гибель клеток) вирусов на клетки, просматривая лунки планшетов под инвертированным микроскопом. Титр вируса оценивали в lg ЦПД₁₀₀ (развитие ЦПД во всех лунках с одинаковым разведением вируса).

Схема эксперимента (таблица): 10-кратные разведения вирусов от 10^{-2} до 10^{-8} или от 10^{-4} до 10^{-10} (в зависимости от активности предварительно «протитрованных» вирусных суспензий) последовательно, начиная с верхнего горизонтального ряда (А), вносили по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов с монослоем клеток. В ряд (Н) вносили поддерживающую среду без

вируса. Контакт вируса с клетками проводили в течение 1 ч при 37°C. После инкубации вирусосодержащую среду удаляли из планшета. В лунки с контрольным (сравнительным) титрованием — 4 вертикальных ряда (№ 9—12) — вносили поддерживающую среду, а в лунки, предназначенные для определения противовирусной активности, добавляли поддерживающую среду, содержащую L-лизин- α -оксидазу: 4 вертикальных ряда (№ 1—4) в концентрации 25 мкг/мл и 4 вертикальных ряда (№ 5—8) — 12,5 мкг/мл.

В работе использовали фермент L-лизин- α -оксидазу из *Trichoderma harzianum* Rifai F-180. Гомогенный фермент получали по ранее разработанной методике [4, 5].

Активность L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости *Trichoderma* рассчитывали по приросту H_2O_2 , количество которой определяли спектрофотометрическим ортодиазидным микрометодом [5].

Результаты и обсуждение

На первом этапе эксперимента оценивалось токсическое действие L-лизин- α -оксидазы на перевиваемые линии клеток. К монослою клеток в лунках планшетов добавляли L-лизин- α -оксидазу в концентрациях 2,0, 1,0, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025, 0,012, 0,006, 0,003, 0,0012, 0,0006 мг/мл. Токсический эффект препарата оценивали по развитию ЦПД. Было установлено, что в обеих линиях клеток выраженный токсический эффект развивается в концентрациях 0,05 мг/мл и выше. Концентрации 0,025 мг/мл и 0,0125 мг/мл (25 и 12,5 мкг/мл) являются максимально допустимыми, хотя и вызывают тормозящее действие на размножение клеток. Для изучения противовирусного действия препарата были выбраны максимальные его концентрации, не вызывающие ЦПД.

Изучение противовирусного действия L-лизин- α -оксидазы на вирусы Западного Нила, Тягиня, Синдбис и Дхори проводились на клетках Vero E6.

В ходе эксперимента установлено, что титр вируса Западного Нила при контрольном титровании составил 9,0 lg ЦПД₁₀₀, а с L-лизин- α -оксидазой как в концентрации 25 мкг/мл, так и 12,5 мкг/мл составил те же 9,0 lg ЦПД₁₀₀. Титр вируса Тягиня в контроле составил 7,0 lg ЦПД₁₀₀, с L-лизин- α -оксидазой в концентрации 25 мкг/мл — 8,0

Ig ЦПД₁₀₀, в концентрации 12,5 мкг/мл — 7,0 Ig ЦПД₁₀₀. Титр вируса Синдбис в контроле составил 6,5 Ig ЦПД₁₀₀, а с L-лизин- α -оксидазой как в концентрации 25 мкг/мл, так и 12,5 мкг/мл составил 7,0 Ig ЦПД₁₀₀. Для вируса Дхори установлено, что титр в контроле составил 7,0 Ig ЦПД₁₀₀, а с L-лизин- α -оксидазой в концентрациях 25 мкг/мл и 12,5 мкг/мл — 7,0 Ig ЦПД₁₀₀.

L-лизин- α -оксидаза не оказывает какого-либо противовирусного действия на вирусы Западного Нила, Тягиня, Синдбис и Дхори, так как не выявлено разницы в титрах вирусов при их титровании с препаратом и без.

Опыты по определению активности L-лизин- α -оксидазы относительно вируса клещевого энцефалита (КЭ) проводились на линии клеток SPEV, так как именно в них развивается ЦПД, вызываемое вирусом КЭ.

Было установлено, что титр вируса в контроле составил 8,0 Ig ЦПД₁₀₀, а с L-лизин- α -оксидазой как в концентрации 25 мкг/мл, так и 12,5 мкг/мл составил 5,0 Ig ЦПД₁₀₀. L-лизин- α -оксидаза оказывает выраженное противовирусное действие (индекс нейтрализации — 3,0 Ig ЦПД₁₀₀).

Отрицательные результаты эксперимента с другими вирусами оказались неожиданными,

особенно с вирусом Западного Нила, который относится к тому же семейству, что и вирус КЭ (*Flaviviridae*). Однако эксперимент с вирусом КЭ проводился на клетках SPEV, а с остальными вирусами на клетках Vero E6. Возможно, противовирусное действие связано с особенностями клеточных линий. В то же время эксперименты по изучению действия рибавирина на вирусы Тягиня и Дхори, проводившиеся на клетках Vero E6, показали его способность подавлять репликацию этих вирусов [11]. А эксперименты по изучению противовирусной активности рибавирина на клетках SPEV относительно КЭ — отрицательные.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований в опытах *in vitro* на модели вируса клещевого энцефалита на сегодняшний день, L-лизин- α -оксидаза — первое вещество, которое ингибирует ЦПД вируса КЭ на перевиваемой линии клеток. Механизм ее противовирусного действия не известен. Нами обнаружено отсутствие активности фермента в отношении вирусов Синдбис, Западного Нила, Тягиня и Дхори.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березина Л.К. Химиопрофилактика и химиотерапия / Арбовирусы и арбовирусные инфекции / Под ред. Д.К.Львова, С.М.Клименко, С.Я.Гайдамович. М.: Медицина, 1989; 156—163.
2. Алексеев С.Б., Березов Т.Т., Анджапаридзе О.Г. и другие. Ингибитор вируса герпеса простого I-го типа. Патент РФ №2022012, 1994.
3. Алексеев С.Б., Веса В.С., Смирнова И.П. и другие. Ингибитор вируса иммунодефицита человека. Патент РФ № 2022011, 1994.
4. Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Биотехнология фермента L-лизин- α -оксидазы из триходермы. М.: Изд.-во «Копиризо». М.: 189.
5. Смирнова И.П., Шкинев В.М., Руднев А.В., Шнейдер Ю.А., Кузовников А.Е. Технологии выделения и очистки L-лизин- α -оксидазы. Журн Биотехнология 2010; 6: 47—54.
6. Смирнова И.П., Шнейдер Ю.А. Штамм — *Trichoderma harzianum* Rifai — продуцент ингибитора вируса кольцевой пятнистости табака (Tobacco ringspot virus). Патент № 2475528, (Р.Ф; Изобретение), Бюллетень Роспатента «Изобретения, полезные модели» № 5, 20.02.2013г.
7. Смирнова И.П., Шнейдер Ю.А. Продуцент ингибитора вируса некритической пятнистости бальзамина. Патент № 2481392 (Р.Ф; Изобретение), Бюллетень Роспатента «Изобретения, полезные модели» № 13, 10.05.2013 г.
8. Смирнова И.П., Ларичев В.Ф. Ингибитор вируса клещевого энцефалита. Патент № 2473689 (Р.Ф; Изобретение), Бюллетень Роспатента «Изобретения, полезные модели» № 3, 27.01.2013 г.
9. Сёмкина О.А., Смирнова И.П., Давахян М.А., Бондаренко О.В. Кишматова Л.М. Разработка состава и технологического геля ранозаживляющего действия. Вестник РУДН, Медицина, 2013; 4: 79—87.
10. Smirnova I.P., Kuznetsova O.M., Ivanova-Radkevich V.I., Orlova V.S., Podboronov V.M., Alexeev A.A. Testing of an antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma harzianum* Rifai F-180. World J Med Sci 2014; 11: 2: 233—236.
11. Белов А. В., Ларичев В. Ф., Галкина И. А., Хуторецкая Н. В., Бутенко А. М., Константинова И. Д., Музыка И. С., Галегов Г. А. Активность отечественного рибавирина в опытах *in vitro* на моделях вирусов крымской геморрагической лихорадки, лихорадки долины Рифт, Тягиня и Дхори. Вopr вирусол 2008; 1: 34—36.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Смирнова Ирина Павловна — Кафедра биохимии РУДН, Москва.

Шнейдер Юрий Андреевич — Кафедра биохимии РУДН, Москва.

Оценка лекарственной устойчивости пробиотических лактобацилл

Н. Л. БРУСЛИК¹, Д. Р. АХАТОВА¹, А. А. ТОЙМЕНЦЕВА¹,
С. Р. АБДУЛХАКОВ^{1,2}, О. Н. ИЛЬИНСКАЯ¹, Д. Р. ЯРУЛЛИНА¹

¹ Институт фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ), Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

² Казанский государственный медицинский университет, Казань

Estimation of Probiotic Lactobacilli Drug Resistance

N. L. BRUSLIK, D. R. AKHATOVA, A. A. TOIMENTSEVA, S. R. ABDULKHAKOV, O. N. ILYINSKAYA, D. R. YARULLINA

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Side) Federal University, Kazan

Kazan State Medical University, Kazan

Проведён анализ устойчивости пробиотических лактобацилл к антибиотикам и лекарственным препаратам, применяемым при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. У 19 штаммов рода *Lactobacillus* (14 штаммов *L. fermentum*, 4 штаммов *L. plantarum* и 1 штамма *L. rhamnosus*), выделенных из коммерческих пробиотиков и кисломолочных продуктов, определены уровни устойчивости к 14 антибиотикам различной природы: β -лактамам, аминогликозидам, макролидам, клиндамицину, ванкомицину, рифампицину, ципрофлоксацину, тетрациклину и хлорамфениколу. Практически все исследованные лактобациллы чувствительны к препаратам первой линии противохеликобактерной терапии — амоксициллину и кларитромицину, что делает нецелесообразным параллельный приём пробиотиков, содержащих изученные лактобациллы, при гастрите и язве желудка, несмотря на известную антагонистическую активность лактобацилл в отношении *Helicobacter pylori*. В то же время лактобациллы устойчивы к действию месалазина, поэтому могут применяться для коррекции дисбиоза при воспалительных заболеваниях кишечника.

Ключевые слова: пробиотические лактобациллы, лекарственная устойчивость, заболевания желудочно-кишечного тракта.

An actual problem of analysis of probiotic lactobacilli resistance to antibiotics and other drugs used in the treatment of gastro-intestinal disturbances has been for the first time solved. The levels of resistance of 19 strains of *Lactobacillus* (14 strains of *L. fermentum*, 4 strains of *L. plantarum* and 1 strain of *L. rhamnosus*) isolated from commercial probiotics and sour milk products to 14 antibiotics of various nature, i.e. β -lactams, aminoglycosides, macrolides, clindamycin, vancomycin, rifampicin, ciprofloxacin, tetracycline and chloramphenicol were determined. All the isolates were practically susceptible to the drugs of the first line antihelicobacterial therapy, i.e. amoxicillin and clarithromycin, that makes inexpedient the parallel use of the probiotics containing the above lactobacilli in the treatment of gastritis and gastric ulcer, despite the lactobacilli antagonism with respect to *Helicobacter pylori*. Lactobacilli are as well resistant to mesalazin and can be used for correction of dysbiosis in inflammatory affections of the intestine.

Key words: probiotic lactobacilli, drug resistance, gastro-intestinal diseases.

Введение

Бактерии рода *Lactobacillus* имеют большое практическое значение, они широко применяются в пищевой отрасли в качестве стартерных культур при производстве кисломолочных продуктов и в медицине как пробиотики. Лактобациллы обладают доказанной эффективностью в лечении и профилактике кишечных инфекций и антибиотикоассоциированных синдромов: острой инфекционной диареи, антибиотикоассоциированной диареи (ААД) [1] и диареи, обусловленной *Clostridium difficile* [2]. Обсуждается возможность применения пробиотиков, в том числе лактобацилл, в индукции и поддержании ремиссии у пациентов с язвенным

колитом [3, 4], лечении синдрома раздражённого кишечника [5] и профилактике колоректального рака [6]. Обнаружено повышение эффективности противохеликобактерной терапии при включении в схемы эрадикации пробиотических препаратов, содержащих лактобациллы [7].

Очевидно, что важным требованием к пробиотическим штаммам является антибиотикорезистентность (АР) — только устойчивые к антибактериальным препаратам бактерии можно совмещать с антимикробной терапией при лечении кишечных инфекций или применять для профилактики ААД. С другой стороны, АР пробиотического штамма может противоречить требованиям лекарственной безопасности. Показано, что у больных с выраженными иммунодефицитными состояниями пробиотические штаммы лактобацилл способны вызывать бактериемию и эндокардиты [8]. Так-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 420008, Казань, Кремлевская, 18. Институт фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ), Казанский (Приволжский) федеральный университет

Таблица 1. Используемые в работе штаммы лактобацилл

Штамм	Источник
<i>Lactobacillus plantarum</i> 8PA3	Препарат «Лактобактерин сухой» (ФГУП НПО «Биомед»)
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-578	Всероссийская коллекция микроорганизмов
<i>Lactobacillus plantarum</i> Ga	Лекарственный препарат «Гастрофарм» (АО «Биовет», Болгария)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1-3	Питьевой йогурт «Вамин» (ОАО Вамин Татарстан)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Питьевой йогурт «Вю Баланс» (ОАО Юнимилк)
<i>Lactobacillus fermentum</i> Na	БАД «Наринэ» (ОАО «Nagex», Армения)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1-1	Питьевой йогурт «Нежный» (ООО Кампина)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1-2	Питьевой йогурт «Простоквашино» (ОАО Юнимилк)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1-5	Питьевой йогурт «Тема» (ОАО Юнимилк)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 3-1	Кисломолочный напиток «Actimel» (фирма Danon)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 3-2	Кисломолочный напиток «Айран» (ООО ФудМилк)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 3-3	Кисломолочный напиток «Дар гор» (ООО ФудМилк)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 3-4	Кисломолочный напиток «Тан» (ООО Продукт «Чистая линия»)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 4-1	Катык «Васькино счастье» (ОАО ЗМК)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 5-1	Ряженка 4% «Чистое поле» (ОАО Чистое поле)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 5-2	Ряженка 2,5% «Наш продукт» (ООО Торговый Дом «Наш Продукт»)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 5-3	Ряженка «Домик в деревне» (ОАО Вимм-Биль-Данн)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 6-1	Кисломолочный напиток «Ацидофилин» (ОАО Вамин Татарстан)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 7-1	Простокваша Мечниковская (ОАО Вамин Татарстан)

же существует риск распространения генов АР в микробиоме человека с помощью конъюгативных плазмид и транспозонов [9–12]. Поэтому определение безопасности лактобацилл — «GRAS-статус» (generally regarded as safe) — сегодня дополнено целым рядом требований. У бактерий, используемых в пробиотиках и в пищевом производстве, недопустимо наличие «мобильных» генов устойчивости к антимикробным агентам и приобретённой АР [13, 14].

Данная работа выполнена с целью выявления устойчивости лактобацилл к антибиотикам и лекарственным препаратам, применяемым в лечении ряда заболеваний желудочно-кишечного тракта. Впервые изучено влияние на лактобациллы 14 антибиотиков девяти различных классов, в том числе амоксициллина и кларитромицина, используемых для эрадикации *Helicobacter pylori*, и 5-аминосалициловой кислоты (месалазина), применяющейся в лечении болезни Крона и язвенного колита.

Материал и методы

Штаммы и условия культивирования. В работе исследовали 19 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, выделенных нами из коммерческих кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов. Бактерии выращивали в жидкой и агаризованной среде MRS («Биокомпас-С», Россия) при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч. Выращивание бактерий на плотных питательных средах проводили в анаэробных пакетах с использованием газогенерирующих анаэробных пакетов GasPak EZ (BD Diagnostics). Данные о динамике роста бактерий получены в 96-луночных полистироловых планшетах Cellstar (Grenier Bio-one) с помощью планшетного ридера Tecan Infinite F200 PRO (Швейцария).

Таксономическая идентификация бактерий. Принадлежность к роду *Lactobacillus* установлена по ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы обнаружения молочнокислых микроорганизмов», видовая идентификация проведена с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. Изолированные колонии микроорганизмов, выросшие на поверх-

ности MRS-агара, наносили в двух повторностях на 96-луночную мишень прибора Microflex Maldi BioTyper (Bruker Daltonics, Германия). На образец настилали 1 мкл раствора матрицы (10 мг/мл α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, растворённой в 50% ацетонитриле, 2,5% трифторуксусной кислоты) и после высыхания проб регистрировали масс-спектры с помощью оснащённого азотным лазером (длина волны 337 нм, частота импульсов 60 Гц) масс-спектрометра Microflex в автоматическом режиме (MALDI Biotyper Realtime Classification).

Лекарственные препараты. В работе использовали диски с антибиотиками (НИЦФ, Россия). Исходный 0,6 М раствор 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК) (Sigma-Aldrich) готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавляли в MRS перед инокуляцией не более 3% от объёма среды.

Чувствительность бактерий к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04 [15]. В 20 мл стерильной агаризованной среды MRS, растопленной и остуженной до 45°C , вносили 1 мл суспензии лактобацилл с плотностью $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, тщательно перемешивали, после чего настилали ровным слоем на чашки Петри. После застывания среды стерильным пинцетом раскладывали на поверхность агара диски с антибиотиками. Чашки инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Чувствительность лактобацилл к антибиотикам оценивали по зонам задержки роста (мм) вокруг дисков. Анализ результатов проводили аналогично МУ 2.3.2.2789-10. 2.3.2.

Чувствительность лактобацилл к 5-АСК исследовали методом серийных разведений в 96-луночных планшетах и диско-диффузионным методом, в котором на застывшую поверхность агара раскладывали стерильные Whatman диски (Sigma-Aldrich) и наносили на них 5 мкл раствора 5-АСК в дистиллированной воде.

Результаты и обсуждение

В данной работе из кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов было выделено 19 штаммов лактобацилл и методом MALDI TOF масс-спектрометрии установлена их принадлежность к видам *L. fermentum* (14 штаммов), *L. plantarum* (4 штамма) и *L. rhamnosus* (1 штамм) (табл. 1). Бактерии *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* не были обнаружены ни в одном из использованных ис-

Таблица 2. Используемые в работе антибактериальные препараты

Антибиотик	Мишень действия в клетке	Концентрация, мкг/диск
β -лактамы	Клеточная стенка	
Ампициллин		10
Амоксициллин		25
Аминогликозиды 1 поколения	Биосинтез белка	
Стрептомицин		30
Канамицин		30
Аминогликозиды 2 поколения	Биосинтез белка	
Гентамицин		10
Аминогликозиды 3 поколения	Биосинтез белка	
Амикацин		30
Макролиды	Биосинтез белка	
Эритромицин		15
Кларитромицин		15
Линкозамиды	Биосинтез белка	
Клиндамицин		2
Гликопептиды	Клеточная стенка	
Ванкомицин		30
Ансамбицины	Нуклеиновые кислоты	
Рифампицин		5
Фторхинолоны 1 поколения	Нуклеиновые кислоты	
Ципрофлоксацин		5
Тетрациклины	Биосинтез белка	
Тетрациклин		30
Хлорамфениколы	Биосинтез белка	
Хлорамфеникол		30

Таблица 3. Интерпретация значений диаметров зон задержки роста при определении чувствительности лактобацилл к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом

Антибиотик	Диаметр зон для культур, мм		
	устойчивых	промежуточных	чувствительных
Ампициллин*	≤8–10	11–20	≥21
Амикацин	≤8–10	11–20	≥21
Амоксициллин	≤8–10	11–20	≥21
Ванкомицин	≤8–10	11–20	≥21
Гентамицин	≤12	13–14	≥15
Канамицин	≤8–10	11–20	≥21
Кларитромицин	≤8–10	11–20	≥21
Клиндамицин	≤8–10	11–20	≥21
Левомецетин	≤8–10	11–20	≥21
Рифампицин	≤15	16–20	≥21
Стрептомицин	≤8–10	11–20	≥21
Тетрациклин	≤16	17–21	≥22
Ципрофлоксацин	≤15	16–20	≥21
Эритромицин	≤8–10	11–20	≥21

Примечание. * — цветом выделено определение согласно МУ 2.3.2.2789-10. 2.3.2.

точников, хотя, согласно N 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» (от 12.06.2008) и сопроводительной информации на упаковках продукции, должны были присутствовать в 10 из 19 источников. Также нам не удалось выделить представителей *L.acidophilus* (из «Наринэ» и ацидофилина) и *L.casei* (из «Actimel»). Несомненно, в видовых названиях исследуемых лактобацилл можно объяснить развитием современных молекулярных методов определения видовой принадлежности, позволяющих более точно установить таксономический статус микроорганизмов.

Оценка чувствительности лактобацилл к антибиотикам. В работе оценили чувствительность лактобацилл к 14 антибиотикам диско-диффузионным методом (табл. 2). Оценку АР часто проводят при исследовании пробиотического потенциала того или иного штамма, тем не менее стандарты определения чувствительности лактобацилл к антибиотикам до сих пор не установлены. Лактобациллы плохо растут на агаре Мюллера-Хилтона [16, 17], рекомендованном для диско-диффузионной оценки АР клинически значимых бактерий [15, 18], поэтому для лактобацилл было предложено использовать среду

Таблица 4. Устойчивость к антибактериальным препаратам бактерий рода *Lactobacillus* из кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов, определенная диско-диффузионным методом

Антибиотик	<i>L. plan- tarum</i> 8PA3	<i>L. plan- tarum</i> B578	<i>L. plan- tarum</i> Ga	1-3	GG	Na	<i>L. fer- mentum</i> 1-1	<i>L. fer- mentum</i> 1-2	<i>L. fer- mentum</i> 1-5	<i>L. fer- mentum</i> 3-1	<i>L. fer- mentum</i> 3-2	<i>L. fer- mentum</i> 3-3	<i>L. fer- mentum</i> 3-4	<i>L. fer- mentum</i> 4-1	<i>L. fer- mentum</i> 5-1	<i>L. fer- mentum</i> 5-2	<i>L. fer- mentum</i> 5-3	<i>L. fer- mentum</i> 6-1	<i>L. fer- mentum</i> 7-1
<i>β</i> -лактамы																			
Ампициллин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Амоксициллин	S	S	S	S	I	I	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
Аминогликозиды 1 поколения																			
Стрептомицин	R	R	R	I	I	R	I	I	R	R	R	R	R	I	I	S	R	R	R
Канамидин	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R
Аминогликозиды 2 поколения																			
Гентамицин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Аминогликозиды 3 поколения																			
Амикацин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Макролиды																			
Эритромицин	I	S	I	I	S	I	S	S	S	S	I	I	S	S	R	S	S	S	S
Кларитромицин	I	I	S	S	S	R	S	S	S	I	S	I	S	I	I	I	I	I	S
Линкозамиды																			
Клиндамицин	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
Гликопептиды																			
Ванкомицин	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	I	I	R	R
Ансамбины																			
Рифамицин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S
Фторхинолоны 1 поколения																			
Ципрофлоксацин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R
Тетрациклины																			
Тетрациклин	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	R	S	S	R	S	S	I
Хлорамфениколы																			
Хлорамфеникол	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	S	S	I	S	S	S

Примечание. S – чувствительный; I – промежуточный; R – устойчивый.

MRS. На этой среде зоны подавления роста бактерий антибактериальным препаратом превышают таковые на агаре Мюллера-Хилтон [17]. Следовательно, при использовании среды MRS необходимо разработать отличные от стандартных критерии оценки АР, на основании которых штаммы лактобацилл относят к чувствительным (S), умеренно чувствительным (промежуточным) (I) и устойчивым (R). К сожалению, многие авторы не приводят значений диаметров зон подавления роста, характерных для чувствительных и устойчивых штаммов [19–21]. Использовали критерии интерпретации результатов, аналогичные приведённым в МУ 2.3.2.2789-10. 2.3.2, дополнив их критериями для антибиотиков, не указанными в данном документе (табл. 3). Кроме того, нами модифицирована стандартная процедура посева [15] таким образом, что суспензию лактобацилл вносили в MRS-агар, поскольку ряд лактобацилл не способен расти при поверхностном посеве на MRS-агар [17].

У лактобацилл обнаружена высокая устойчивость к ципрофлоксацину и ванкомицину — у 84 и 68% штаммов, соответственно (табл. 4). Резистентность к этим антибиотикам среди лактобацилл встречается достаточно часто [16, 20, 22, 23] и, вероятно, является природной [22]. Также исследованные лактобациллы демонстрировали высокую устойчивость к аминогликозидным антибиотикам, что ранее было показано в работах [16, 19, 20]. Пониженную чувствительность бактерий рода *Lactobacillus* к аминогликозидам также считают природной и связывают с низкой проницаемостью антибактериальных препаратов этой группы через мембраны лактобацилл

[19, 20, 22]. Точная локализация генетических детерминант устойчивости к ципрофлоксацину и аминогликозидам, а следовательно, и их потенциальная мобильность у лактобацилл пока не установлены [24]. Для исследуемых видов лактобацилл (*L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *L.fermentum*) показано, что резистентность к ванкомицину кодируется хромосомными генами, она неиндуцибельна и не может передаваться [25, 26].

Согласно М. Danielsen и А. Wind [16], горизонтальному транспорту особенно подвержены гены устойчивости к хлорамфениколу, эритромицину и тетрациклину. Бактерии рода *Lactobacillus*, как правило, чувствительны к этим антибиотикам [16, 20, 23] и в целом к ингибиторам биосинтеза белка, кроме аминогликозидов [24]. В соответствии с этими фактами, у исследованных нами лактобацилл из пробиотиков и кисломолочных продуктов широко распространена чувствительность к хлорамфениколу, макролидам (эритромицину, кларитромицину), линкозамидам (клиндамицину) и тетрациклину (см. табл. 4). Большинство исследованных лактобацилл также демонстрировали чувствительность к рифампицину (84% штаммов) и β -лактамам (100% штаммов к ампициллину и 95% штаммов — к амоксициллину) (см. табл. 4).

Полученные нами данные об антибиотикорезистентности широко известного пробиотического штамма *L.plantarum* 8РАЗ в основном согласуются с данными литературы [27]. Однако наши исследования выявили резистентность этого штамма к гентамицину. Поскольку природная устойчивость лактобацилл к аминогликозидам зависит от условий выращивания и повышается в анаэробных условиях [28], расхождения с [27] в результатах тестирования устойчивости к гентамицину (аминогликозиду 2 поколения) можно объяснить разными условиями выращивания штамма. Ранее диско-диффузионным методом было показано, что бактерии *L.plantarum* 8РАЗ устойчивы к тетрациклину, но гены устойчивости не удалось обнаружить [27]. В данной работе, напротив, представители этого штамма демонстрировали чувствительность к тетрациклину, что согласуется с их генетической программой.

Таким образом, большинство исследованных лактобацилл имеют профиль резистентности, типичный для данной группы микроорганизмов. Особую тревогу вызывает обнаружение резистентности к эритромицину у *L.fermentum* 5-1 и к тетрациклину у *L.fermentum* 3-4 и 5-2. Поскольку гены, кодирующие устойчивость к этим антибиотикам, часто оказываются мобильными [16], необходимы дальнейшие исследования по выяснению природы обнаруженной устойчивости у лактобацилл и способности к её распространению в микробиоме кишечника человека.

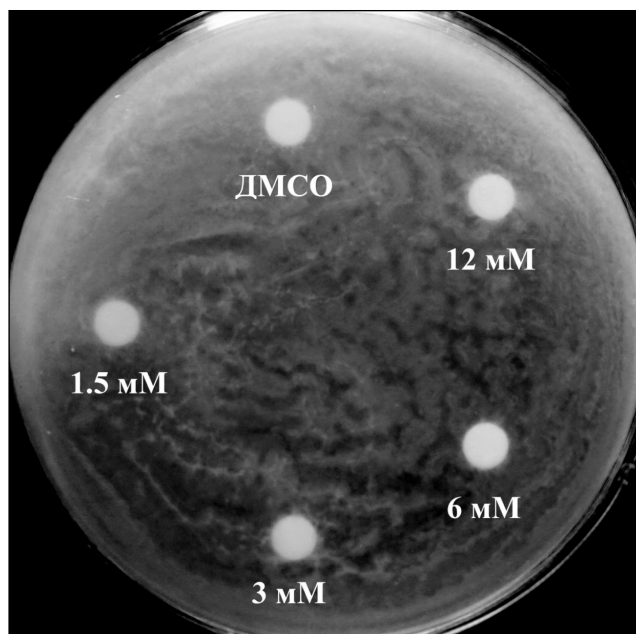


Рис. 1. Анализ чувствительности *L.fermentum* 3-4 к ДМСО и различным концентрациям 5-АСК диско-диффузионным методом.

Отсутствие зон подавления роста бактерий вокруг дисков свидетельствует о том, что данные лактобациллы нечувствительны к 5-АСК.

Изучение целесообразности использования лактобацилл в противохеликобактерной терапии.

Основная рекомендованная схема эрадикации *H.pylori*, так называемая первая линия тройной терапии, включает два антимикробных препарата (амокксициллин и кларитромицин) и один антисекреторный препарат — ингибитор протонной помпы [29]. По отношению к амоксициллину большинство бактерий проявляли чувствительность, кроме устойчивого штамма *L.fermentum* 1-5. К кларитромицину все штаммы были также в разной степени чувствительными за исключением *L.fermentum* Na (см. табл. 4). Ни один штамм не был устойчив к обоим рассматриваемым антибиотикам. Таким образом, исследованные лактобациллы не будут вносить вклад в эффективность противохеликобактерной терапии. Известно, что содержащие лактобациллы пробиотики повышают степень эрадикации *H.pylori*, если применяются в течение 3—4 недель до начала терапии [30, 31]. В. S. Sheu с соавт. приводят шесть возможных механизмов, благодаря которым пробиотики повышают эффективность противохеликобактерной терапии, в том числе антагонистическая активность лактобацилл (конкуренция за питательный субстрат и сайты адгезии в кишечнике) [30]. Обнаруженная чувствительность лактобацилл к кларитромицину и амоксициллину практически исключает вклад указанных механизмов и выдвигает в качестве наиболее вероятной причины положительного действия лактоба-

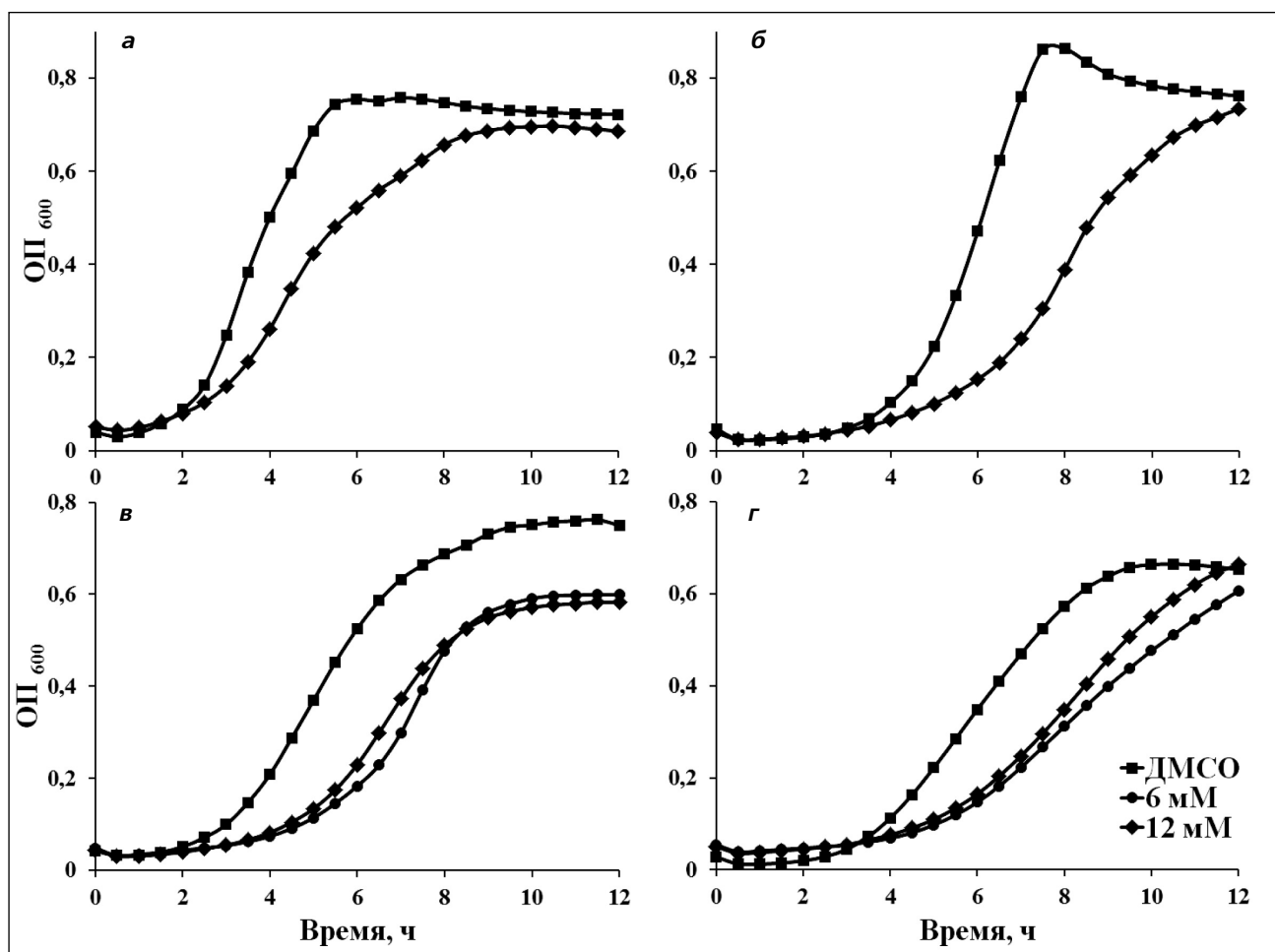


Рис. 2. Влияние 5-АСК на рост культур *L. plantarum* Ga (а), *L. fermentum* Na (б), *L. fermentum* 5-1 (в) и *L. fermentum* 1-2 (г).

По оси абсцисс — время (часы); по оси ординат — оптическая плотность при 600 нм (ОП 600).

цилл при лечении хеликобактерной инфекции их способность увеличивать барьерные функции организма за счёт стимуляции выработки муцина и иммуномодуляторного действия [32, 33].

Оценка устойчивости лактобацилл к месалазину. Месалазин (5-аминосалициловая кислота, 5-АСК) является препаратом первой линии терапии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), таких как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит. В патогенезе хронического воспаления кишечника важную роль отводят дисбалансу кишечной микрофлоры (дисбиозу) [4], поэтому пробиотики привлекаются в качестве дополнительных средств терапии этих заболеваний [3]. В нашей работе впервые изучено влияние 5-АСК на жизнеспособность чистых культур лактобацилл. С помощью диско-диффузионного метода установлено, что 5-АСК в концентрациях до 12 мМ не оказывает влияния на рост исследуемых лактобацилл (рис. 1). Методом серийных разведений также показано, что все штаммы лактобацилл устойчивы к 5-АСК — в исследованном диапазоне концентраций 5-АСК (0,03–12 мМ)

МПК не обнаружена. У некоторых лактобацилл (*L. plantarum* Ga, *L. fermentum* Na и 1-2) 5-АСК в наивысших из исследованных концентраций 6 и 12 мМ увеличивает продолжительность лаг- и лог-фазы, хотя не влияет на выход биомассы (рис. 2, а, б, в). У *L. fermentum* 5-1, помимо вышеуказанного эффекта, выявлено снижение урожая культуры (рис. 2, в). Известно, что токсичность 5-АСК отличается для разных представителей кишечной микрофлоры: 5-АСК не влияет на рост *E. coli*, *Streptococcus faecalis* [34] и *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* [35], но снижает рост *Bacteroides* и *Clostridium* [34], а также *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, возможного этиологического агента ВЗК [36]. Приём месалазина изменяет соотношение различных групп микроорганизмов в кишечной микрофлоре [37–39], в основном представителей *Firmicutes* и *Bacteroidetes* [38, 39]. Вероятно, лактобациллы, как члены филы *Firmicutes*, не чувствительные к действию месалазина, оказывают благоприятное влияние на данное соотношение при приёме месалазина. Более того, безвредность этого веществ-

ва для лактобацилл аргументирует концепцию использования пробиотиков параллельно с месалазином при лечении ВЗК. Для обоснования данной терапевтической схемы необходимы исследования *in vivo* и клинические наблюдения, а также тестирование токсичности для бактерий более высоких концентраций 5-АСК. Концентрации 5-АСК до 12 мМ использованы нами как биологически релевантные, согласно J. Kaufman с соавт. [35], хотя известно, что в фекалиях содержание месалазина составляет 10–100 мМ [40], поскольку для достижения терапевтического эффекта необходима постоянная высокая концентрация препарата.

Заключение

Таким образом, впервые получены данные об устойчивости лактобацилл, выделенных нами из кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов, к клинически распространённым антибиотикам, в том числе применяемым для эра-

дикации *H. pylori*, а также к месалазину — препарату для лечения болезни Крона и язвенного колита. Значимость полученных результатов для составления обоснованных тактических схем применения пробиотических лактобацилл при этиотропной антибактериальной терапии, а также для лечебной коррекции и профилактики дисбиотических состояний, не вызывает сомнений.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (При-волжского) федерального университета с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ (ID RFME-FI59414X0003) и частичным финансированием за счёт средств субсидии Минобрнауки России в целях реализации федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (Соглашение № 14.575.21.0076, ID RFMEFI57514X0076).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sazawal S., Hiremath G., Dhingra U., Malik P., Deb S., Black R.E. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 374–382.
2. Pillai A., Nelson R. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 23: 1: CD004611.
3. Ghouri Y.A., Richards D.M., Rahimi E.F., Krill J.T., Jelinek K.A., DuPont A.W. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2014; 7: 473–487.
4. Matsuoka K., Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol* 2015; 37: 1: 47–55.
5. Camilleri M. Probiotics and irritable bowel syndrome: rationale, putative mechanisms, and evidence of clinical efficacy. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006; 40: 264–269.
6. Rafter J., Bennett M., Caderni G., Clune Y., Hughes R., Karlsson P.C., Klinder A., O'Riordan M., O'Sullivan G.C., Pool-Zobel B., Rechkemmer G., Roller M., Rowland I., Salvadori M., Thijs H., Van Loo J., Watzl B., Collins J.K. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 488–496.
7. de Bortoli N., Leonardi G., Cancia E., Merlo A., Bellini M., Costa F., Mumolo M.G., Ricchiuti A., Cristiani F., Santi S., Rossi M., Marchi S. *Helicobacter pylori* eradication: a randomized prospective study of triple therapy versus triple therapy plus lactoferrin and probiotics. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 5: 951–956.
8. Cannon J.P., Lee T.A., Bolanos J.T., Danziger L.H. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 1: 31–40.
9. Mathur S., Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria — a review. *Int J Food Microbiol* 2005; 105: 3: 281–295.
10. Devigiliis C., Zinno P., Perozzi G. Update on antibiotic resistance in food-borne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Front Microbiol* 2013; 8: 4: 301.
11. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожеев П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объём, разнообразие и развитие. *Антибиотики и химиотер* 2013; 58: 5–6: 38–48.
12. van Reenen C.A., Dicks L.M. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Arch Microbiol* 2011; 193: 3: 157–168.
13. Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Guéguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol* 2008; 126: 3: 278–285.
14. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2008. Technical guidance on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal* 2008; 732: 1–15.
15. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (МУК 4.2.1890-04). *Клин Микробиол Антимикроб Химиотер* 2004; 6: 4: 306–359.
16. Danielsen M., Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 2003; 82: 1: 1–11.
17. Ocaña V., Silva C., Nader-Macias M.E. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal lactobacilli. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006; 2006: 18182.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997.
19. Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot* 1998; 61: 12: 1636–1643.
20. Kirtzalidou E., Pramatefaki P., Kotsou M., Kyriacou A. Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe* 2011; 17: 6: 440–443.
21. Wang C.Y., Lin P.R., Ng C.C., Shyu Y.T. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe* 2010; 16: 6: 578–585.
22. Katla A.K., Kruse H., Johnsen G., Herikstad H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 1–2: 147–152.
23. Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int J Food Microbiol* 2006; 111: 3: 234–240.
24. Gueimonde M., Sánchez B., G de Los Reyes-Gavilán C., Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol* 2013; 4: 202.
25. Klein G., Hallman C., Casas I.A., Abad J., Lowers J., Reuter G. Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J Appl Microbiol* 2000; 89: 815–824.
26. Saarela M., Mättö J., Mattila-Sandholm T. Safety aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotic products. *Microb Ecol Health Dis* 2002; 14: 233–240.
27. Ботина С.Г., Полужктова Е.У., Глазова А.А., Захаревиц Н.В., Коробан Н.В., Зинченко В.В., Бабыкин М.М., Жиленкова О.Г., Амерханова А.М., Даниленко В.Н. Характеристика устойчивости к антибиотикам по-

- тенциальных пробиотических бактерий рода *Lactobacillus* из гастроинтестинальной микробиоты человека. Микробиология 2011; 80: 2: 1—9.
28. Davis B.D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. Microbiol Rev 1987; 51: 3: 341—350.
 29. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Atherton J., Axon A.T., Bazzoli F., Gensini G.F., Gisbert J.P., Graham D.Y., Rokkas T., El-Omar E.M., Kuipers E.J., European Helicobacter Study Group. Management of *Helicobacter pylori* infection — the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut 2012; 61: 5: 646—664.
 30. Sheu B.S., Cheng H.C., Kao A.W., Wang S.T., Yang Y.J., Yang H.B., Wu J.J. Pretreatment with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. Am J Clin Nutr 2006; 83: 4: 864—869.
 31. Deguchi R., Nakaminami H., Rimbara E., Noguchi N., Sasatsu M., Suzuki T., Matsushima M., Koike J., Igarashi M., Ozawa H., Fukuda R., Takagi A. Effect of pretreatment with *Lactobacillus gasseri* OLL2716 on first-line *Helicobacter pylori* eradication therapy. J Gastroenterol Hepatol 2012; 27: 5: 888—892.
 32. Pacifico L., Osborn J.F., Bonci E., Romaggioli S., Baldini R., Chiesa C. Probiotics for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in children. World J Gastroenterol 2014; 20: 3: 673—683.
 33. Lesbros-Pantoflickova D., Corthésy-Theulaz I., Blum A.L. *Helicobacter pylori* and probiotics // J Nutr. 2007; 137: 3: 812S—818S.
 34. Sandberg-Gertzen H., Kjellander J., Sundberg-Gill B., Järnerot G. In vitro effects of sulphasalazine, azodisal sodium, and their metabolites on *Clostridium difficile* and some other faecal bacteria. Scand J Gastroenterol 1985; 20: 5: 607—612.
 35. Kaufman J., Griffiths T.A., Surette M.G., Ness S., Rioux K.P. Effects of mesalamine (5-aminosalicylic acid) on bacterial gene expression. Inflamm Bowel Dis 2009; 15: 7: 985—996.
 36. Greenstein R.J., Su L., Shahidi A., Brown S.T. On the action of 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine on *M.avium* including subspecies paratuberculosis. PLoS One 2007; 2: 6: e516.
 37. Swidsinski A., Loening-Baucke V., Bengmark S., Lochs H., Dörffel Y. Azathioprine and mesalazine-induced effects on the mucosal flora in patients with IBD colitis. Inflamm Bowel Dis 2007; 13: 1: 51—56.
 38. Rioux K.P., Bibiloni R., Tannock G.W., Dieleman L.A., Fedorak R.N. Aminosaliculates alter the dominant phylogenetic profile of fecal bacteria in mice. Gastroenterology 2005; 128: A663.
 39. Andrews C.N., Griffiths T.A., Kaufman J., Vergnolle N., Surette M.G., Rioux K.P. Mesalazine (5-aminosalicylic acid) alters faecal bacterial profiles, but not mucosal proteolytic activity in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther 2011; 34: 3: 374—383.
 40. Williams C., Panaccione R., Ghosh S., Rioux K. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. Therap Adv Gastroenterol 2011; 4: 4: 237—248.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Яруллина Дина Рашидовна — к.м.н., кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ) Казанского (Приволжского) федерального университета (КФУ), старший научный сотрудник OpenLab «Маркеры патогенеза» ИФМиБ КФУ, E-mail: kasfes@gmail.com

Бруслик Наталия Леонидовна — аспирант кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ) Казанского (Приволжского) федерального университета (КФУ).

Ахатова Диана Раузиловна — студентка 5 курса кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ) Казанского (Приволжского) федерального университета (КФУ).

Тойменцева Анна Александровна — к.м.н., научный сотрудник ИФМиБ КФУ, главный инженер проекта Масс-спектрометрической лаборатории МЦКП КФУ для обеспечения клеточных, геномных и постгеномных исследований в Приволжском регионе.

Абдулхаков Сайяр Рустамович — к.м.н., старший научный сотрудник OpenLab «Генные и клеточные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ) Казанского (Приволжского) федерального университета (КФУ), доцент кафедры нормальной анатомии, кафедры общей врачебной практики Казанского государственного медицинского университета.

Ильинская Ольга Николаевна — д.б.н., профессор, академик Академии наук Республики Татарстан, заведующий кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Определения чувствительности микробных клеток к сульфаниламидным препаратам методом электрооптического анализа

О. И. ГУЛИЙ^{1,2,3}, В. Д. БУНИН⁴, О. С. ЛАРИОНОВА², Е. Г. ПОТЕМКИНА², О. В. ИГНАТОВ¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

² Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

³ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАН, Саратов

⁴ EloSystem GbR, Берлин, Германия

Determination of Microbial Susceptibility to Sulfanilamides by Electrooptic Analysis

O. I. GULIY, V. D. BUNIN, O. S. LARIONOVA, E. G. POTEKINA, O. V. IGNATOV

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov

N. I. Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov

Sarstov Research Veterinary Institute, Russian Academy of Sciences, Saratov

EloSystem GbR, Berlin, Germany

Исследовано влияние сульфаниламидных препаратов (на примере стрептоцида растворимого) на изменение электрофизических (ЭФ) свойств микробных клеток *Escherichia coli* штаммов XL-1, BL-Ril, *Pseudomonas putida* C-11 и BA-11. Установлено, что существенные изменения в ориентационных спектрах (ОС) суспензий клеток, инкубированных с различными концентрациями сульфаниламидного препарата, приводит к изменению величины электрооптического (ЭО) сигнала суспензии клеток на первых пяти частотах ориентирующего электрического поля (10–1000 кГц) при использовании стрептоцида растворимого в концентрации 0,3 мкг/мл. Изучение динамики воздействия препарата на микробные клетки показало, что происходит снижение величины ЭО сигнала после 5 мин воздействия препарата на ~59% от контрольного значения (клетки без воздействия сульфаниламидного препарата), при последующем воздействии сульфаниламидного препарата величина ЭО сигнала клеток практически не изменялась (в пределах 5%). Установлено, что изменения в ОС суспензий клеток при действии стрептоцида растворимого были различными для чувствительных и резистентных штаммов микробных клеток. Показана возможность регистрации активности сульфаниламидных препаратов методом электрооптического анализа в отношении клеточных суспензий. Выявленные изменения ОС микробных суспензий при действии сульфаниламидов можно использовать в качестве теста на чувствительность к данному соединению у исследуемых клеток.

Ключевые слова: сульфаниламидные препараты, *Escherichia coli*, микробные клетки, чувствительность, стрептоцид растворимый.

The effect of sulfanilamides (soluble streptocid as an example) on changing of the electrophysical properties (EP) of microbial cells of *Escherichia coli* XL-1, BL-Ril, *Pseudomonas putida* C-11 and BA-11 was studied. It was shown that significant changes in the orientation spectra (OS) of the cell suspensions incubated at various concentrations of the sulfanilamide resulted in changing of the electrooptic (EO) signal of the cell suspension at the first five frequencies of the orientation electric field (10–1000 Hz) with the use of soluble streptocid in a concentration of 0.3 mcg/ml. The dynamics of the drug effect on the microbial cells demonstrated a decrease of the EO signal value 5 minutes after the exposure by ~59% vs. the control (the cells not exposed to the drug). During the following exposure the EO signal value practically did not change (within 5%). The changes of the OS of the cell suspensions exposed to soluble streptocid significantly differed for the susceptible and resistant strains. Determination of the activity of sulfanilamides by electrooptic analysis of microbial cell suspensions was considered possible. Changing of the microbial suspension OS under the effect of sulfanilamides can be used as a test on the microbial cell susceptibility to drugs.

Key words: sulfanilamides, *Escherichia coli*, microbial cells, susceptibility, soluble streptocid.

Введение

Сульфаниламидные препараты — группа химически синтезированных соединений, используемых для лечения инфекционных болезней, главным образом бактериального происхожде-

ния. Сульфаниламиды стали первыми лекарственными средствами, позволившими проводить успешную профилактику и лечение разнообразных бактериальных инфекций. Благодаря этим препаратам, вошедшим в медицинскую практику с 1930 годов, удалось значительно снизить смертность от воспаления лёгких, заражения крови и многих других бактериальных инфекций. Сульфаниламидные препараты были открыты немец-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 410049 Саратов, пр. Энтузиастов, 13. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

кой корпорацией «И.Г.Фарбениндустри» в ходе исследований азокрасителей — синтетических красителей, в структуру которых входит сульфаниламид. В 1909 г. была получена краска — хризоидин, по своей прочности превосходящая многие другие, существовавшие в то время. В 1913 г. было установлено, что хризоидин обладает бактерицидным действием, и после испытания он был предложен как лекарственный препарат под названием пиридиум. В 1932 г. химики немецкого концерна «И.Г.Фарбениндустри» получили прontosил (красный стрептоцид) и в этом же году запатентовали несколько азокрасителей, в том числе и прontosил. А в 1934 г. венгерский ученый-фармаколог Г.Домагк открыл небывалое по тем временам лечебное действие красного стрептоцида у мышей [1]. С появлением пенициллина и других антибиотиков, а в последнее время фторхинолонов, применение сульфаниламидов несколько сократилось, однако значения препараты этой группы не потеряли и в ряде случаев они успешно используются при инфекционных заболеваниях, вызванных чувствительными к ним микроорганизмами. Поэтому проблема определения активности сульфаниламидных препаратов в отношении микробных клеток весьма актуальна.

Сульфаниламиды препятствуют синтезу дигидрофолиевой кислоты в микробной клетке из глютаминовой и парааминобензойной кислот [2]. В результате такого взаимодействия происходит изменение проницаемости мембран по отношению к специфическим ионам или молекулам, что, в свою очередь, может приводить к изменению электрофизических (ЭФ) свойств микробных клеток. Данные изменения могут быть зарегистрированы методом электроориентации клеток в переменном электрическом поле [3–5]. Ранее нами проводились исследования по изучению изменений электрофизических свойств микробных клеток под влиянием ряда антибиотиков [6, 7]. С нашей точки зрения, перспективным направлением исследований является использование метода ЭО анализа клеточных суспензий для определения активности сульфаниламидов, обладающих, в отличие от антибиотиков, бактериостатическим механизмом действия. Целью данной работы является оценка изменений электрофизических свойств микробных клеток *Escherichia coli* при воздействии на них сульфаниламидных препаратов на примере стрептоцида растворимого.

Материал и методы

Микроорганизмы. В работе использовали бактерии штаммов *Escherichia coli* XL-1, BL-Ril, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Штаммы *Pseudomonas putida* C-11 и BA-11 получены из Саратовского НИИ «Биокатализа».

Микробные клетки выращивали на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): NaCl — 10; дрожжевой экс-

тракт — 5; пептон — 5. Культивирование проводили в аэробных условиях на круговой качалке (160 об/мин) при постоянной температуре 30°C в течение 18 ч. Выращенные клетки использовали для ЭО исследований.

Подготовка клеток к электрооптическому анализу. Перед проведением ЭО анализа клетки отмывали трёхкратным центрифугированием при 2800×g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве дистиллированной воды (электропроводность 1,8 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Для устранения конгломератов суспензию клеток вновь центрифугировали при 110×g в течение 1 мин и использовали суспензию, оставшуюся в надосадочной жидкости. Затем доводили оптическую плотность подготовленной суспензии D_{670} для каждого вида использованных микроорганизмов до 0,4–0,42.

Проведение электрооптического анализа клеточных суспензий. Измерение ориентационных спектров (ОС) клеток проводили на электрооптическом анализаторе ELUS («Государственный научный центр прикладной микробиологии», Россия) с дискретным набором частот ориентирующего электрического поля 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц как описано в работе [3] при 670 нм, напряженности электрического поля 17 В/см, времени его приложения 16 с. Длина оптического пути электрооптической ячейки составляла 8 мм, объём — 1 мл, концентрация клеток — $4,5 \times 10^8$ клеток/мл. Количество клеток определяли стандартным методом с использованием светового микроскопа (Ergaval, Carl Zeiss, Jena, Германия).

Ориентационный спектр представлялся в виде зависимости разности значений оптической плотности суспензий (δOD) на длине волны 670 нм от частоты воздействующего электрического поля при распространении пучка неполяризованного света вдоль и поперек направления ориентирующего поля. Эта разность была нормирована по значению оптической плотности при 670 нм для хаотически ориентированных клеток. Для измерений использовались относительные единицы, которые с точностью до константы, равной примерно $1-5 \times 10^{-32}$, соответствовали анизотропии поляризуемости частиц с размерностью Φ/m^2 .

Все анализы проводились, по крайней мере, в пяти повторностях, и результаты представлены в виде средних значений, полученных с указанием стандартного отклонения. Относительная погрешность результатов измерений стандартных образцов составляла $\pm 3\%$.

Определение чувствительности микробов к сульфаниламидным препаратам. Проводили методом серийных разведений [8]. Количество препарата в пробирке с отчетливо видимой задержкой микробного роста представляет минимальную подавляющую концентрацию для испытываемого штамма.

Обработка клеток сульфаниламидным препаратом. Суточные культуры микробных клеток подготавливали для ЭО анализа, после чего в суспензию клеток ($D_{670} = 0,4-0,45$) вносили стрептоцид растворимый (Sigma, США). Суспензия клеток с препаратом инкубировалась при 30°C в течение 5, 15, 20, и 30 минут. В качестве контроля использовалась суспензия клеток, инкубированная при той же температуре то же время без добавления препарата. После инкубации клетки отмывались трижды в дистиллированной воде (1,6–2,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$) и использовались для ЭО измерений.

Результаты и обсуждение

Микроорганизмы в своем развитии синтезируют фолиевую кислоту. В процессе метаболизма фолиевая кислота превращается в дигидрофолиевую, из которой образуется тетрагидрофолиевая кислота. Последняя контролирует биосинтез аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований. Механизм противомикробного действия сульфаниламидов связан с их конкурентным антагонизмом с *п*-аминобензойной кислотой, ко-

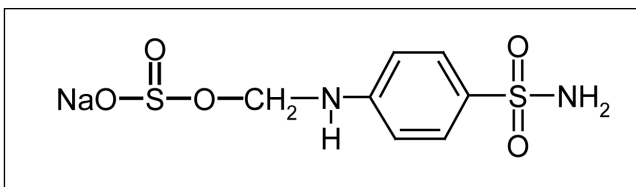


Рис. 1. Структурная формула стрептоцида растворимого.

торая включается в структуру фолиевой кислоты. Но в присутствии сульфаниламидов фермент, осуществляющий биосинтез фолиевой кислоты, вместо *p*-аминобензойной кислоты использует её имитатор-антагонист (сульфамидный фрагмент). В результате микроорганизм вместо фолиевой кислоты синтезирует псевдофолиевую кислоту. Эти изменения в структуре блокируют образование нормальных метаболитов. В результате угнетается синтез нуклеиновых кислот, вследствие чего рост и размножение микроорганизмов подавляется (в чем и проявляется бактериостатический эффект) [9].

Поскольку сульфаниламидные препараты активны в отношении ряда грамотрицательных палочек, в качестве объекта исследования использовались микробные клетки *E.coli*. В связи с тем что сульфаниламидные препараты имеют общий механизм действия, в наших исследованиях был использован один вид сульфаниламидного препарата — стрептоцид растворимый (*Streptocidum solubile*).

Стрептоцид растворимый (*Streptocidum solubile*), (*p*-аминобензол-сульфамид) — препарат, хорошо растворимый в воде, эффективен при стрептококковых, гонококковых, пневмококковых и колибациллярных инфекциях. Структурная формула препарата представлена на рис. 1. Препарат активен в отношении грамположительных и грамотрицательных кокков, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Yersinia pestis*, *Chlamydia* spp., *Actinomyces israelii*, *Toxoplasma gondii*.

Первоначально проводили исследования с использованием клеток *E.coli* штамма XL-1. Бактериостатическое действие сульфаниламидов проявляется только при определённой концентрации препаратов в окружающей микробов среде. Эта концентрация должна быть достаточна для предотвращения использования микроорганизмами *p*-аминобензойной кислоты, содержащейся в тканях. Поэтому изначально проводили эксперименты по определению оптимальной концентрации препарата. Для этого в суспензию клеток изучаемого штамма вносили сульфаниламидный препарат в разных концентрациях и регистрировали изменения ЭО параметров суспензии. При исследовании изменений

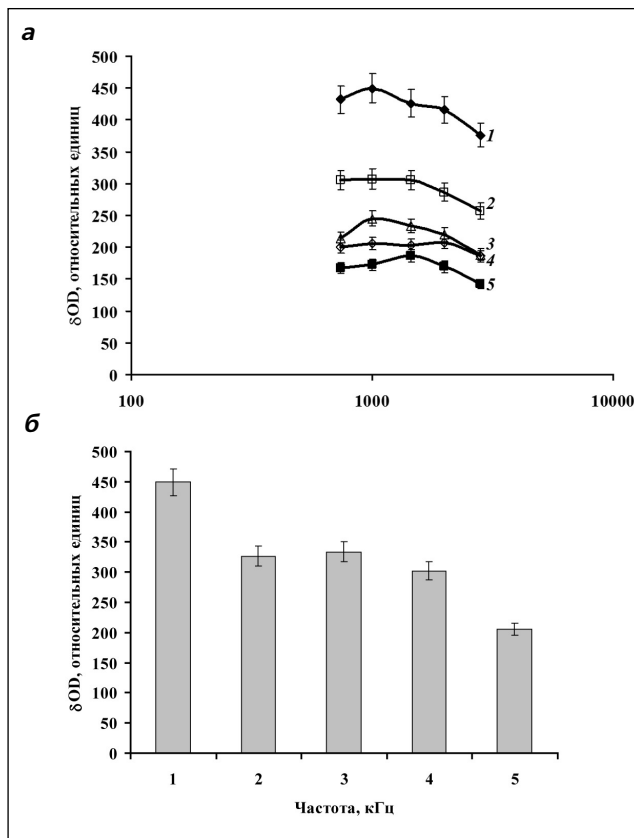


Рис. 2. (а) Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток *E.coli* XL-1 при действии разных концентраций стрептоцида растворимого. б. Изменение величины ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 1000 кГц: 1 — контроль (суспензия клеток без добавления препарата); суспензия клеток с добавлением разных концентраций препарата: 2 — 0,04; 3 — 0,08; 4 — 0,3; 5 — 0,6 мкг/мл.

ЭО характеристик клеточной суспензии клеток *E.coli* штамма XL-1 при действии стрептоцида растворимого в разных концентрациях (0,04, 0,08, 0,3, 0,6 мкг/мл) было показано, что изменения в ОС суспензий клеток *E.coli* XL-1 имели место на частотах ориентирующего электрического поля в интервале 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц (рис. 2). Поскольку ранее нами было показано, что ЭО анализатор фиксирует значительные изменения ЭО параметров суспензии клеток в течении 5—10 мин воздействия антибактериального препарата [6—7], то на данном этапе время воздействия стрептоцида растворимого составляло 10 мин. Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 1000 кГц (см. рис. 2).

Как видно из представленных данных (см. рис. 2), происходит снижение величины ЭО сигнала суспензии клеток штамма XL-1 при концентрации стрептоцида растворимого 0,04 мкг/мл на 35% по сравнению с контролем (клетки без воздействия сульфаниламидного препарата). При этом макси-

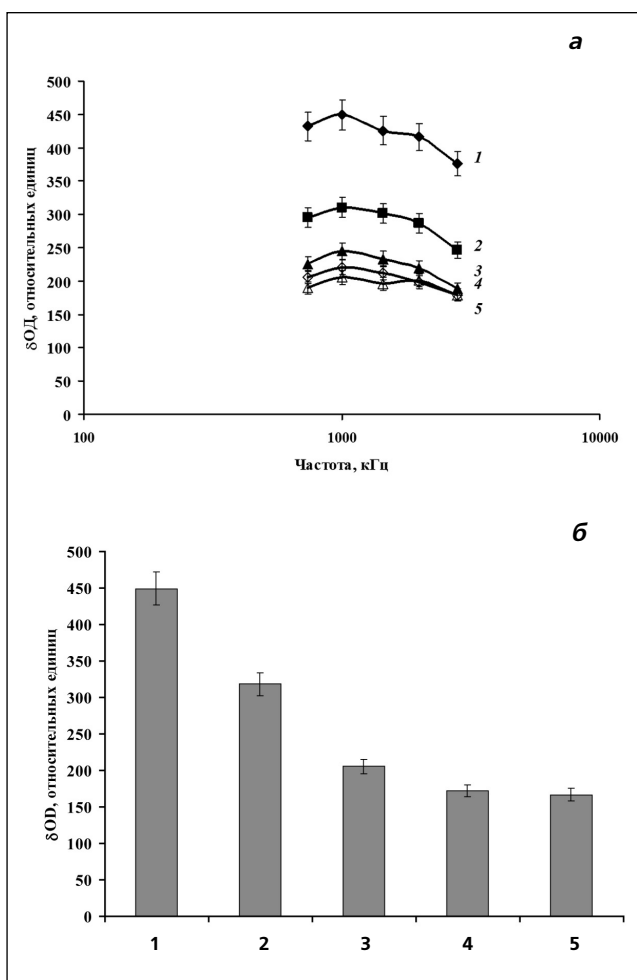


Рис. 3. (а) Динамика изменения ОС клеток *E.coli* XL-1, инкубированных с стрептоцидом растворимым (0,3мкг/мл): 1— контроль суспензия клеток без добавления препарата; суспензия клеток с добавлением препарата: 2 — 5 мин; 3 — 10 мин; 4 — 20 мин; 5 — 30 мин. **б.** Изменение величины ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 1000 кГц.

мальное снижение величины ЭО сигнала суспензии клеток наблюдается при концентрации сульфаниламидного препарата 0,6 мкг/мл — на ~77% по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение концентрации сульфаниламида не приводило к существенным изменениям величины ЭО сигнала, и изменения величины ЭО сигнала фиксировались в пределах ~5%. Уменьшение величины ЭО сигнала клеток при концентрации сульфаниламида 0,3 и 0,6 мкг/мл, возможно, обусловлено разбуханием клеток, прекращением размножения и бактериостатическим действием препарата в отношении клеток *E.coli* штамма XL-1. В последующих экспериментах использовали концентрацию препарата 0,3 мкг/мл.

При изучении динамики воздействия сульфаниламидного препарата (концентрация 0,3 мкг/мл) на микробные клетки штамма XL-1 в течение 5, 10, 20, 30 мин было показано, что происходит снижение величины ЭО сигнала после 5 мин воз-

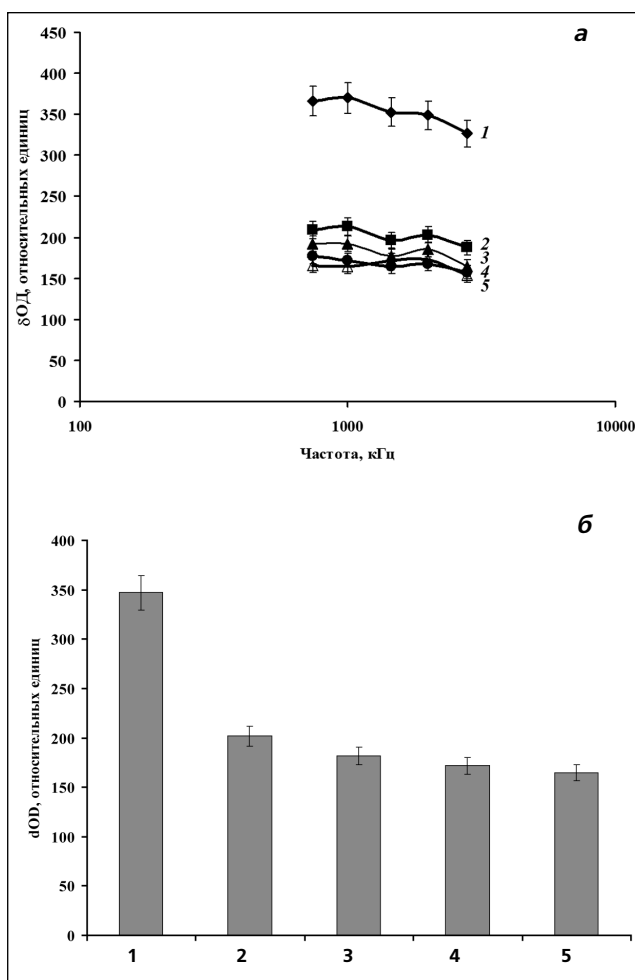


Рис. 4. (а) Динамика изменения ОС клеток *E.coli* BL-Ril, инкубированных с стрептоцида растворимого (0,3мкг/мл): 1 — контроль (суспензия клеток без добавления препарата); суспензия клеток с добавлением препарата: 2 — 5 мин; 3 — 10 мин; 4 — 20 мин; 5 — 30 мин. **б.** Изменение величины ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 1000 кГц.

действия на 30%, после 10 мин воздействия — на 59% от контрольного значения (клетки без воздействия сульфаниламидного препарата); при последующем воздействии сульфаниламидного препарата величина ЭО сигнала клеток практически не изменялась (рис. 3, а). Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 1000 кГц (рис. 3, б).

Таким образом, регистрируя изменения ЭО параметров суспензии клеток при добавлении стрептоцида растворимого, можно сделать вывод о том, что используемый препарат активен в отношении клеток *E.coli* штамма XL-1, т. е. данный микроорганизм является чувствительным к изучаемому веществу.

На следующем этапе проводились исследования с микробными клетками *E.coli* другого штамма BL-Ril. Для этого в суспензию клеток штамма BL-Ril вносили стрептоцид растворимый в concentra-

ции 0,3 мкг/мл и фиксировали изменения величины ЭО сигнала через разные временные промежутки (рис. 4). Было показано, что величина ЭО сигнала после 5 мин воздействия уменьшается на 67% от контрольного значения (клетки без воздействия сульфаниламидного препарата), при последующем воздействии сульфаниламидного препарата величина ЭО сигнала клеток практически не изменялась (в пределах ~5%) (рис. 4, а). Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 1000 кГц (рис. 4, б).

Как видно из полученных данных, при инкубации клеток штаммов XL-1 и BL-Ril с сульфаниламидным препаратом происходит значительное снижение величины ЭО сигнала, вероятно, микробные клетки данных штаммов являются чувствительными к стрептоциду растворимому. В результате действия сульфаниламидного препарата на микробные клетки происходит изменение проницаемости мембран по отношению к специфическим ионам или молекулам, что, в свою очередь, приводит к изменению электрофизических свойств микробных клеток. Снижение сигнала в области частот 200 кГц–1 МГц обусловлен изменением электропроводности цитоплазмы при прочих равных условиях (постоянном ОД, электропроводности среды и электропроводности суспензии). В растущих клетках — это свидетельствует о повышении концентрации ионов органических кислот, ионов калия, протонов и т.д. с учётом степени их диссоциации от внутреннего значения pH. Как результат воздействия препарата происходит повышение ЭО сигнала на активной фазе и устранение за счёт активного транспорта ионов наружу при завершении процесса. В стационарной культуре — это либо активный транспорт, либо, что более вероятно, перфузия мембраны, когда локальные повреждения мембраны способствуют более сильному пассивному транспорту ионов по градиенту во внешнюю непроводящую среду.

На частотах 500 кГц–1 МГц величина ЭО сигнала линейно связана с величиной удельной электропроводности клеточной цитоплазмы. Поэтому нормировка ЭО спектра, полученного после воздействия антибактериального препарата, на величину сигнала от чистой культуры клеток на частоте, например 1 МГц, позволяет определить изменение степени проницаемости мембраны. При пассивной диффузии через мембрану степень её проницаемости определяется количеством вновь образованных пор. При малых повреждениях мембраны по изменению нормированного ЭО сигнала таким образом можно напрямую определять кинетику изменения этого параметра.

На следующем этапе проводились эксперименты по изучению изменений ЭО параметров

суспензии клеток других микроорганизмов. В качестве тестируемых объектов использовали микробные клетки 2 штаммов *Pseudomonas putida* С-11 и ВА-11. Для этого к суспензии клеток *P.putida* С-11 добавляли стрептоцид растворимый (0,3 мкг/мл), при этом время воздействия составляло 5, 10, 20, 30 мин, и измеряли ЭО параметры клеток. В результате исследований было показано, что значительных изменений величины ЭО сигнала суспензии клеток при воздействии стрептоцида растворимого не происходит. Для микробных клеток *P.putida* ВА-11 получены аналогичные результаты. Из полученных данных можно заключить, что микробные клетки *P.putida* С-11 и ВА-11 устойчивы к воздействию изучаемого препарата.

Таким образом, в результате проведённых исследований показано, что изменения ОС суспензий при действии стрептоцида растворимого можно использовать в качестве показателя активности препарата в отношении микробных клеток. В настоящее время для определения чувствительности микробов к сульфаниламидным препаратам используют стандартные методы диффузии в гель агара с применением дисков, методы серийных разведений, а также модификации этих стандартных методик [8]. Наиболее доступным интегральным методом оценки качества определения чувствительности является сопоставление результатов определения чувствительности (МПК или диаметров зон подавления роста) контрольных (референтных) штаммов микроорганизмов с соответствующими показателями, приведёнными в их паспортной характеристике. Тестирование контрольных штаммов проводят в соответствии с описанными методами, параллельно тестированию клинических изолятов [10]. Кроме того, созданы автоматизированные системы для определения активности антибактериальных препаратов. В одних системах автоматизированы только операции разведения и инкубации, тогда как рост бактерий определяется традиционными методами. В других системах все начальные операции выполняются вручную и автоматизированы лишь этапы считывания и регистрации результатов. Некоторые системы автоматизации предусматривают создание программ для всех операций, используемых в определении (приготовление образца и бактериального посевного материала, инкубация, считывание результатов и их регистрация) [11–14]. Основные проблемы данных методов состоят в сборе и подготовке образца, длительности получения результата, устранении ложноположительных результатов. Поэтому проблема разработки новых технологий и методов определения активности препаратов к бактериям весьма актуальна для микробиологии, медицины и ветеринарии. Основываясь на полу-

ченных данных, можно сделать вывод, что использование метода ЭО анализа клеточных суспензий для определения чувствительности бактерий к сульфаниламидным препаратам является достаточно перспективным. В отличие от стандартных методов, использование метода ЭО анализа для определения активности сульфаниламидных препаратов в отношении микробных клеток имеет ряд преимуществ, к которым отно-

сится быстрота получения результата, простота анализа, кроме того, определение может быть осуществлено в минимальных объемах.

Использование ЭО метода анализа клеточных суспензий при воздействии на них сульфаниламидов может предоставлять, с нашей точки зрения, широкие возможности для решения различных биотехнологических задач, в том числе, и для определения антибактериальной активности препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Domagk G. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen, Deutsche Medizinische Wochenschrift 1935; 61: 250—253.
2. Краткая Медицинская Энциклопедия, издательство «Советская Энциклопедия», М.: 1989.
3. Ignatov O.V., Guliy O.I., Shchyogolev S.Yu., Bunin V.D., Ignatov V.V. Effect of P-nitrophenol metabolites on microbial cell electrophysical properties. FEMS Microbiol Lett 2002; 214:1: 81—86.
4. Bunin V.D., Voloshin A.G. Determination of cell structures, electrophysical parameters, and cell population heterogeneity. J Colloid Interface Sci 1996; 180: 122—126.
5. Маршелл Э. Биофизическая химия. М.: Мир, 1981; 1: 347—358.
6. Гулий О.И., Маркина Л.Н., Игнатов О.В., Щеголев С.Ю., Зайцева И.С., Бунин В.Д., Игнатов В.В. Влияние ампициллина на электрофизические свойства клеток *Escherichia coli*. Микробиология 2005; 74: 1: 126—131.
7. Гулий О.И., Маркина Л.Н., Бунин В.Д., Игнатов В.В., Игнатов О.В. Исследование электрооптических параметров суспензий клеток *Escherichia coli* при действии канамицина. Микробиология 2008; 77: 3: 380—385.
8. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхарда. М.: Мир, 1984; 1: 458—464.
9. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. III издание. Учебник. Пятигорск, 2003.
10. Методические указания МУК 4.2.1890-04.
11. Galindo E., Bautista D., Garcia J.L., Quintero R. Microbial sensor for penicillins using a recombinant strain of *Escherichia coli*. Enzym Microb Technol 1990; 12: 9: 642—646.
12. Galindo E., Lagunas F., Osuna J., Soberon X., Garcia J.L. A microbial biosensor for 6-aminopenicillanic acid. Enzym Microb Technol 1998; 23: 5: 331—334.
13. Fleschin S., Bala C., Bunaciu A.A., Panait A., AboulEnein H.Y. Enalapril microbial biosensor. Preparat Biochem Biotechnol 1998; 28: 3: 261—269.
14. Cavalieri S.J., Biehle J.R., Sanders W.E. JR. Synergistic activities of clarithromycin and antituberculous drugs against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrobial Agents Chemother 1995; 39: 7: 1542—1545.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гулий Ольга Ивановна — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова; ведущий научный сотрудник Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института Российской академии наук.

Бунин Виктор Дмитриевич — д.т.н., научный руководитель фирмы EloSystem GbR, Берлин, Германия.

Ларионова Ольга Сергеевна — д.б.н., заведующий кафедрой микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова.

Потемкина Елена Григорьевна — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова.

Игнатов Олег Владимирович — д.б.н., заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук.

Устойчивость к антибиотикам микроорганизмов, взятых из длительно незаживающих ран и облучённых светом различных длин волн

М. М. РАСУЛОВ¹, И. Г. МОТОРИНА², Г. Г. ЮШКОВ¹, О. М. ДРОЗДОВА², Н. В. КОРСАКОВА²

¹ ГосНИИ химии и технологии элементоорганических соединений, Москва,

² Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-пасс, Иркутск

Antibiotic Resistance of Microbial Isolates from Long-Term Healing Wounds Exposed to Light of Various Wave Lengths

M. M. RASULOV, I. G. MOTORINA, G. G. YUSHKOV, O. M. DROZDOVA, N. V. KORSAKOVA

State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, Moscow

Road Clinical Hospital, Irkutsk-Pass, Irkutsk

Приводятся данные о подавлении роста микроорганизмов характерного спектра и антибиотикоустойчивости, взятых из длительно незаживающих ран, светом различных волновых диапазонов. Посеянные на кровяном агаре растущие колонии подвергались облучению поляризованным светом, красным и инфракрасным прерывистым, ультрафиолетовым средне- и коротковолновым непрерывным в режимах, принятых в физиотерапии ран. Воздействие светом в той или иной мере вызывало подавление роста, но эффект полной санации достигался только при ультрафиолетовом облучении, подтверждённый количественно в виде величины КОЕ.

Ключевые слова: микробиология раны, воздействие светом.

The data on inhibition of the growth of microorganisms of a characteristic spectrum and antibiotic resistance isolated from long-term healing wounds by light of various wave ranges are presented. The growing cultures on blood agar were exposed to polarized light, red and infrared, ultraviolet of medium- and short-wave continuous modes accustomed in physiotherapy of wounds. The effect of light in some way induced inhibition of the growth, but complete recovery was stated only after the use of ultraviolet light when confirmed quantitatively in terms of the CFU.

Key words: wound microbiology, light exposure.

Роль микробного фактора в развитии инфекционного процесса в ранах неоспорима, поскольку в подавляющем большинстве случаев обуславливает специфику и особенности динамики заживления раны и определяет выбор эффективной терапии при данной патологии [1]. Следует учитывать и то обстоятельство, что в последние годы под мощным селективным давлением антибактериальных препаратов произошли существенные изменения в структуре возбудителей хирургических и нозокомиальных инфекций.

В литературе приводятся примеры успешного применения светолечения ран [2]. Тем не менее остаётся открытым вопрос о спектре микроорганизмов, остающихся в ране при светотерапии, их устойчивости к антибиотикам, широко применяемым при лечении ран, и о их фоточувствительности.

Цель данной работы — определить степень влияния различных приёмов воздействия светом на культуру микроорганизмов (*in vitro*), полученных из биологического материала больных с длительно незаживающими ранами.

Материал и методы

На первом этапе работы была определена высеваемость и структура основных групп микроорганизмов из клинического материала хирургических отделений клинической больницы за четыре последних года.

На втором этапе была получена информация о чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам.

На третьем этапе раневое содержимое, взятое стерильным тампоном, в 1 мл виноградно-сахарного бульона засеивалось на чашку Петри с 5% кровяным агаром способом «тампон — петля». Такой посев позволяет выделить микроорганизмы в виде отдельных колониеобразующих единиц (КОЕ) даже из ассоциации микроорганизмов и провести их количественный анализ.

Все работы с микроорганизмами выполнялись в соответствии с действующим Приказом Минздрава СССР № 535 от 22.04.1985 об обязательном соблюдении «Методических указаний по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования», раздел 1.6

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 111123 Москва, ул. Шоссе Энтузиастов, 38. ГосНИИ химии и технологии элементоорганических соединений

Таблица 1. Характеристика приёмов облучения колоний

Группа	Тип аппарата	Оптический диапазон	Длина волны, нм	Режим	Мощность облучения	Расстояние от торца облучателя до поверхности агара, см	Время облучения за сеанс, мин
1	Биоптрон компакт	Поляризованный свет	480—3400	Непрерывный	20 мВт	5	1—5 2—6 3—7
2	Рикта 04/4	Инфракрасный	890—980	Импульсный	40 мВт	1	Через день 1000 Гц — 5
3	Рикта 04/4	Инфракрасный	890—980	Импульсный	40 мВт	1	Переменная частота — 2
4	Матрикс	Красный	630	Непрерывный	30 мВт	1	Переменная частота — 2
5	ОРК-21	Ультрафиолетовый средневолновой (в)	240 320	Непрерывный	100 Вт/м ²	100	1—1 2—2 3—3
6	БОП-4 Лампа ВРМ	Ультрафиолетовый коротковолновой (с)	180 280	Непрерывный	140 Вт/м ²	12	1—8 2—8 3—8
7	Солис лампа ЛКС-250	Ультрафиолетовый средневолновой (в)	280—320	Непрерывный	300 Вт/м ²	150	1—2 2—2 3—2

(применительно к инфицированным ранам). Для оценки эффекта облучения засеивалась вся поверхность агара. После этого половина открытой чашки Петри (вторая прикрывалась светонепроницаемым стерильным материалом) проводилось облучение по схеме (табл. 1), но в течение трёх дней, так как при каждом открывании чашки был возможен подсев микроорганизмов, а эффект санации, если он был, достигался именно в первые дни. Количество облучённых чашек в каждой группе — 10. Необлучённая половина чашки принималась за контроль. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ «Microsoft Office Excel 2007» и «Biostat». Достоверность отличий принимали при $p < 0,05$, обозначая в таблицах звёздочкой.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в спектре микробов из ран 2531 больного хирургических отделений больницы за последние 4 года преобладает микрофлора, относящаяся к *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus epidermidis*, а также группа грамотрицательных энтеробактерий, причём процент их высеваемости оставался довольно стабильным. Следует от-

метить и тот факт, что высеваемость MRSA несколько снизилась, в то время как *S.epidermidis* — повысилась (табл. 2).

Сравнительно высокой оказалась устойчивость выделенных из ран микроорганизмов к антибиотикам: почти половина из исследованных микроорганизмов оказалась устойчивой к 8—10 антибиотикам (табл. 3).

Воздействие светом разных волновых диапазонов на рост колоний микроорганизмов, наиболее пригодных для объективизации эффекта, привело к той или иной степени подавления их роста, но о санации можно было судить только в случае ультрафиолетового облучения (УФО) средневолнового и более всего — коротковолнового диапазона, при этом MRSA проявил выраженную устойчивость даже к УФО (табл. 4).

Попытка определить степень подавления роста микроорганизмов в зависимости от времени УФО позволила установить выраженную сана-

Таблица 2. Высеваемость основных групп микроорганизмов из клинического материала хирургических больных отделений ДКБ за 2011—2014 гг.

Показатель	2011	2012	2013	2014
Число исследований	594	680	636	621
Выделено культур	525	585	506	517
Высеваемость, %	88,4	86,0	79,5	83,2
Микробный спектр, %				
<i>S.aureus</i>	29,0	35,9	32,2	27,1
MRSA	4,6	4,1	4,7	3,8
<i>S.epidermidis</i>	12,0	14,7	14,6	19,9
<i>E.coli</i>	6,3	4,3	4,7	6,4
Грамотрицательные УПМ	10,8	12,4	10,6	10,4
<i>Enterococcus</i> spp.	8,0	6,1	9,5	7,5
<i>Acinetobacter</i> spp.	—	4,4	2,0	6,4
<i>P.aeruginosa</i>	3,6	3,0	3,0	5,0
Грибы рода <i>Candida</i>	12,2	13,0	14,2	9,1

Примечание. УПМ — условно-патогенные микроорганизмы.

Таблица 3. Чувствительность к антибиотикам микрофлоры, выделенной из клинического материала у больных стационара ДКБ (на примере 2012 г.)

Вид микрофлоры	Выделено	Исследовано	Количество устойчивых	%	Антибиотики
<i>S.aureus</i>	210	186	24	13	Оксациллин Абактал Амоксиклав Цефтриаксон Цефазолин Цефотаксим Гентамицин Ципролет
<i>S.epidermidis</i>	86	64	21	32,8	То же
<i>P.aeruginosa</i>	18	16	16	94	Цефазолин Цефотаксим Цефтриаксон Цефоперазон Норфлоксацин Гентамицин Амоксиклав Нетилмицин
<i>E.coli</i>	25	20	16	64	Цефазолин Цефотаксим Гентамицин Азлоциллин Ципрофлоксацин Норфлоксацин Амикацин
<i>Acinetobacter</i> spp.	26	26	26	100	Абактал Нетилмицин Цефазолин Цефотаксим Цефтазидим Ципрофлоксацин Азлоциллин Цефоперазон Карбапенемы
<i>Enterococcus</i> spp.	36	35	17	48,5	Абактал Амоксиклав Цефазолин Цефотаксим Цефтриаксон
<i>Bacillus subtilis</i>	41	41	41	100	Абактал Ципролет Азлоциллин Эритромицин Цефотаксим Цефтазидим Цефазолин Цефтриаксон Азлоциллин Нетилмицин Цефоперазон
Всего	442	390	161	41,3	Ципролет

цию (по величине КОЕ) для *S.aureus* уже с первой минуты облучения приборами как средне-, так и коротковолнового диапазона. Для MRSA время отчётливого подавления роста колоний при облучении БОП-4, равным 5 минутам, при облучении ОРК-21 — 3 минутам (табл. 5).

Известно, что в микробном спектре длительно незаживающих ран в различных сочетаниях встречаются *S.aureus*, MRSA, *P.aeruginosa* и грамотрицательные энтеробактерии и другие микроорганизмы, свойственные хирургическому отде-

лению стационара, причём с той или иной степенью устойчивости к антибиотикам. Кроме этого, многочисленными клиническими наблюдениями и в условиях эксперимента был установлен [3] количественный предел (1×10^5 микробных тел в 1 г ткани, взятой из глубины раны), ниже которого инфекционный процесс в ране, а тем более генерализованный, как правило, не развивается. Это соответствует 10^5 и более КОЕ [4]. В лечебной стратегии и тактике ведения больных с раневыми повреждениями кожи, естественно, ведущее мес-

Таблица 4. Результаты ежедневного облучения открытой половины чашек Петри через 3 сеанса (КОЕ)

Тип аппарата	Тип бактерий			
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	MRSA	<i>E.coli</i>
Контроль	392±10,5	402±11,8	407±11,0	409±12,1
Биоптрон-про	390±12,3	401±11,4	412±10,3	408±12,6
Рикта 04/4	380±14,8	399±15,1	410±11,8	419±13,4
Рикта 04/4 Матрикс	370±16,5	353±16,2	408±12,3	366±28,1
Матрикс	390±17,0	320±18,1*	414±13,1	390±24,9
ОРК-21М1	28±4,6*	9±3,4*	307±21,5*	7±2,1*
БОП-4 лампа ВРМ	13±5,2*	2±0,8*	198±24,3*	2±0,4*
«СОЛИС», лампа ЛКС-250	26±5,0*	11±1,2*	360±16,0*	9±0,8*

Примечание. * — отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$.

Таблица 5. Количество КОЕ на облученной половине чашки Петри в зависимости от времени облучения светом ультрафиолетового диапазона

Тип бактерий и прибор	Контроль	Время облучения, мин						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>S.aureus</i> БОП-4	400±12,8	26±4,4*	21±4,2*	17±1,8*	11±0,9*	9±0,5*	7±0,5*	6±1,2*
<i>S.aureus</i> ОРК-21	399±12,0	18±5,9*	11±3,4*	4±1,8*	1±0,35*#	—	—	—
MRSA БОП-4	403±14,3	460±18,2	419±22,3	412±24,1	380±26,5	260±18,8*	160±24,1*	—
MRSA ОРК-21	408±12,4	430±16,7	323±24,0	122±20,1*#	111±18,9*#	—	—	—

Примечание. * — отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$; # — отличие по эффекту диапазонов достоверно при $p < 0,05$.

то принадлежит хирургическим приёмам, в то же время совершенно не исключается активная антимикробная терапия и физиотерапия (светолечение) [5]. И все это с учётом микробиологического фактора.

Вместе с тем отметим, что авторы вышеуказанного труда [1] считают целесообразным различать понятия «бактериальное загрязнение раны» и «инфицированная рана», обозначающие состояния, при которых в первом случае общие и локальные механизмы защиты способны подавить жизнедеятельность попавших в рану микроорганизмов и никаких клинических признаков инфекционного процесса не проявляется, а во втором — развивается инфекционный процесс. При этом считают, что тип микроорганизмов не играет роли в плане риска развития инфекции, поскольку преимущественно соответствует условиям, в которых проводится лечение больных [6]. Однако представляется, что полученные нами результаты

требуют углубления анализа и большей объективизации в сторону создания доступной для лечебных учреждений системы светотерапии в стремлении максимального повышения качества жизни пациентов с длительно незаживающими ранами. В плане этого, появляется необходимость пересмотра стандартных рекомендаций по обработке ран световыми волнами различными по диапазонам, интенсивности и длительности, поскольку нозокомиальные инфекции имеют свои особенности в каждом регионе и в каждой больнице.

Таким образом, устойчивость изученных микроорганизмов к антибиотикам частично совпадает с их устойчивостью к воздействию светом. Результаты проведённых исследований дополнительно объективизируют факт saniрующего действия УФО, особенно коротковолнового диапазона. Полученные данные могут быть использованы в организации комплексного лечения больных с длительно незаживающими ранами.

ЛИТЕРАТУРА

- Кузин М.И., Костюченко Б.М. Раны и раневая инфекция. М.: Медицина. 1990; 149—168.
- Шуб Г.М., Алипов В.В., Шаповал О.Г., Беляев П.А. Микробиологическая оценка результатов лечения ожоговых ран кожи в эксперименте. Интернет-ресурс: www.Medconfer.com/node/1252.
- Александр Дж.У., Гуд Р.Р. Иммунология для хирургов: пер.с англ. М.: Медицина. 1974; 191.
- Анализы. Полный справочник. М.: Эксмо. 2009; 437.
- Кудзоев О.А. Актуальные вопросы хирургического лечения больных с локальными глубокими ожогами. Комбустиология 2003; 15.
- Rennekampff H.O., Bushe M.N., Knoblich K. Is UV radiation beneficial in postburn wound healing? Med Hypothes 2010; 75: 5: 436—438.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Расулов Максуд Мухамеджанович — начальник отдела ГНЦ РФ ГосНИИ химии и технологии элементоорганических соединений

Кинетика вирусной нагрузки HCV-RNA в сыворотке крови и периферических мононуклеарных клетках при применении безинтерфероновой схемы терапии (Циклоферон + Рибавирин) у пациента с циррозом печени в исходе хронического вирусного гепатита С

В. В. СТЕЛЬМАХ¹, В. К. КОЗЛОВ^{1,2,3}, А. Н. НЕКРАСОВА¹

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

³ Университет им. Ярослава Мудрого, Великий Новгород

Kinetics of Virus Load HCV-RNA in Blood Serum and Peripheral Mononuclear Cells in a Patient with Hepatocirrhosis and Chronic Virus Hepatitis C Termination Treated According to Noninterferon Treatment Scheme (Cycloferon + Ribavirin)

V. V. STELMAH, V. K. KOZLOV, A. N. NEKRASOVA

I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg

St. Petersburg State University, St. Petersburg

Yaroslav Mudryi University, Velikiy Novgorod

Представлен клинический случай пациента с циррозом печени в исходе хронического вирусного гепатита С, генотип 1b. Учитывая наличие цирротической стадии заболевания, внепечёночную репликацию HCV в периферических мононуклеарах, неблагоприятный генотип HCV, неблагоприятный полиморфизм гена IL-28B, неэффективность двух предшествующих курсов стандартной противовирусной терапии (ПегИФН+Рибавирин), вторичную иммунную недостаточность, пациенту был проведён 24-недельный курс безинтерфероновой противовирусной терапии: интерферон-индуктивная терапия циклофероном в сочетании с рибавирином. К 12-й неделе от начала терапии была достигнута биохимическая ремиссия, существенное снижение вирусной нагрузки с 1×10^7 МЕ/мл до 7×10^5 МЕ/мл в сыворотке крови и с $1,35 \times 10^7$ МЕ/мл до 8×10^5 МЕ/мл в периферических мононуклеарах. Исследование молекулярно-биологических маркёров виремии (ПЦР HCV-RNA) в клетках периферических мононуклеаров является необходимой диагностической технологией при подозрении на внепечёночные формы HCV-инфекции. Кинетика вирусной нагрузки и положительная динамика иммунологических показателей у пациента на цирротической стадии ХГС свидетельствуют об эффективном этиопатогенетическом подходе с применением безинтерфероновой схемы (циклоферон + рибавирин) при наличии противопоказаний к применению препаратов рекомбинантных интерферонов (ИФН).

Ключевые слова: гепатит С, цирроз, вирусная нагрузка, циклоферон.

A clinical case of hepatocirrhosis with chronic hepatitis C termination (1b genotype) is described. Taking into account the cirrhotic stage of the disease, the extrahepatic HCV replication in the peripheral mononuclears, unfavourable HCV genotype, unfavourable IL-28B gene polymorphism, inefficiency of the previous two courses of the standard antiviral therapy (PegIFN + ribavirin) and secondary immune deficiency, noninterferon antiviral therapy for 24 weeks was used in the treatment of the patient: interferon-inductive therapy with cycloferon in combination with ribavirin. There was observed by the 12th week of the treatment biochemical remission and a significant decrease of the virus load from 1×10^7 IU/ml to 7×10^5 IU/ml in the blood serum and from 1.35×10^7 IU/ml to 8×10^5 IU/ml in the peripheral mononuclears. Investigation of the molecular biological markers of the viremia (PCR HCV-RNA) in the cells of peripheral mononuclears is an obligatory diagnostic technology in cases with suspected extrahepatic HCV infection. The kinetics of the virus load and the positive dynamics of the immunological indices in the patient at the cirrhotic stage of chronic virus hepatitis C are indicative of the efficient etiopathogenic approach with the use of the noninterferon treatment scheme (cycloferon + ribavirin), when recombinant interferons are contraindicated.

Key words: hepatitis C, cirrhosis, virus load, cycloferon.

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 191015 Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41. Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова

Введение

По данным ВОЗ гепатит С представляет собой серьёзную социально-экономическую и клинико-эпидемиологическую проблему здравоохранения всех стран мира: в настоящее время хронической HCV-инфекцией страдает около 185 млн человек, населяющих Земной шар, ежегодно от осложнений портальной гипертензии на фоне хронической HCV-инфекции умирает около 500 000 человек [1, 2].

Предупреждение риска прогрессирования хронической HCV-инфекции и её осложнений особенно актуально для пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) на стадии тяжёлого фиброза. Доказано, что риск развития гепатоцеллюлярной карциномы у больных с тяжёлым фиброзом (циррозом) печени, получавших стандартную противовирусную терапию (ПВТ) и достигнувших устойчивого вирусологического ответа (УВО), минимален, в то время как у пациентов с циррозом печени, не получавших ПВТ, составляет 15% [3, 4].

В этой связи при выявлении хронической HCV-инфекции на стадии тяжёлого фиброза или компенсированного цирроза печени рекомендовано незамедлительно начинать ПВТ пегилированными интерферонами и нуклеозидными аналогами [5]. Однако наличие у пациента тяжёлого фиброза или цирроза печени наряду с высокой вирусной нагрузкой, генотипом 1b рассматриваются как предикторы неблагоприятного ответа на предстоящую ПВТ. Применение ПВТ у больных ХГС на цирротической стадии заболевания сопряжено с развитием большого количества осложнений и, как следствие этого — возникновение необходимости в снижении эффективной курсовой дозы противовирусных препаратов или вовсе прекращения ПВТ [6—9].

Приходится констатировать, что существует целая популяция пациентов с ХГС на стадии тяжёлого фиброза (цирроза) печени, не отвечающих на стандартную ПВТ или же демонстрирующих ранние рецидивы HCV-инфекции после окончания лечения [10—12].

На протяжении последних лет исследуется эффективность новых противовирусных стратегий в лечении ХГС, которые включают применение препаратов прямого противовирусного действия (ингибиторов протеаз) как в сочетании с пегилированными интерферонами и рибавирином, так и без него [13]. Добавление ингибиторов протеаз к двойной ПВТ в меньшей степени повышает её эффективность у пациентов с «нулевым ответом», увеличивая риски неблагоприятных явлений у больных ХГС на цирротической стадии [14—16].

В России, учитывая ограниченность выделяемых на здравоохранение ресурсов, применение тройных схем ПВТ оказывается малодоступной

медицинской технологией. В большинстве случаев от проведения этиологической терапии при циррозе печени в исходной стадии ХГС воздерживаются, и лечебные мероприятия сводятся к динамическому наблюдению, а при развитии осложнений портальной гипертензии — к их коррекции.

Недостаточная эффективность этиотропной терапии зачастую связана с развитием на фоне хронической HCV-инфекции вторичной иммунной недостаточности [17], которая обусловлена способностью данного вируса персистировать не только в гепатоцитах, но и в клетках иммунной системы [18]. При этом интенсифицируется апоптоз иммунных клеток, изменяется характер ответа на возбудителя за счёт развития дисфункции иммунной системы.

Прогрессирование ХГС связано не только с прямым цитопатическим действием вируса на гепатоциты, но, в большей степени, со структурно-функциональными повреждениями иммунокомпетентных клеток. Так, по результатам выполненного исследования [19], установлено, что для пациентов с циррозом печени в исходе ХГС характерен субпопуляционный дисбаланс на фоне абсолютной лимфопении.

В этой связи дополнение схем ПВТ препаратами патогенетической направленности, имеющими своей целью коррекцию иммунных нарушений, позволяет повысить эффективность предстоящей противовирусной терапии [20]. Это особенно актуально в сложных для лечения популяциях больных с ХГС, в частности у пациентов, имеющих тяжёлый фиброз (цирроз) печени сложного «трудного» генотипа (1b, 4) с высокой вирусной нагрузкой, не ответивших на ранее проводимую стандартную ПВТ.

Альтернативным подходом в лечении ХГС является использование индукторов интерферонов, которые обладают рядом существенных преимуществ перед препаратами ИФН: эндогенный ИФН, вырабатываемый в ответ на введение интерферогенов, не обладает антигенностью, его синтез в организме сбалансирован и подвергается контрольно-регуляторным механизмам, обеспечивающим защиту организма от перенасыщения [21].

Отечественный индуктор интерферонов — Циклоферон, препарат акридинового ряда, разработан ООО «НТФФ «ПОЛИСАН» (Санкт-Петербург), характеризуется мягким пролонгированным иммунокорригирующим эффектом. Формы выпуска: ампулы по 2 мл 12,5% раствора (для внутримышечного или внутривенного введения). Циклоферон способствует образованию в организме лейкоцитами, макрофагами, фибробластами, эндотелиальными клетками α -, β - и γ -интерферонов, оказывает иммуномодулирующее действие [22].

Индукция активного синтеза интерферонов с помощью индукторов является альтернативным подходом к лечению больных ХГС.

В Российской Федерации при лечении больных ХГС имеется и расширяется клиническая практика использования в схемах комбинированной противовирусной терапии иммунокорректирующих цитокиновых препаратов. Результаты проведенных к настоящему времени исследований эффективности комбинированной противовирусной терапии с включением индуктора интерфероногенеза циклоферона при ХГС однозначно свидетельствуют о её эффективности [23, 24].

Представляется актуальной разработка лечебной тактики в отношении пациентов с циррозом печени в исходной стадии ХГС, у которых имеются неблагоприятные предикторы для предстоящей противовирусной терапии (как со стороны вируса гепатита С, так и со стороны организма), а также отсутствие ответа на предшествующие курсы стандартной противовирусной терапии (ПегИФН+Рибавирин).

В статье представлено клиническое наблюдение пациента Я. с циррозом печени в исходе ХГС (генотип 1b, внепечёночная репликация в периферических мононуклеарах, неблагоприятный полиморфизм гена IL-28B (rs 8099917) — вариант G/G, (rs 12979860) — вариант T/T), ранее не ответившего на два стандартных курса противовирусной терапии (ПегИФН+Рибавирин) и продемонстрировавшего существенное снижение вирусной нагрузки HCV в двух средах организма (сыворотке крови и периферических мононуклеарах), улучшение функционального состояния печени при проведении безинтерфероновой схемы лечения с применением индуктора интерфероногенеза циклоферона и нуклеотидного аналога рибавирина.

Материал и методы

В клинике внутренних болезней и нефрологии СЗГМУ им. И. И. Мечникова под нашим наблюдением, начиная с мая 2013 г. по настоящее время, находился пациент Я., 49 лет, по роду занятий — менеджер.

Анамнез и клинико-диагностические данные в динамике наблюдения. Из анамнеза известно, что в 2009 г. при прохождении обследования впервые были обнаружены антитела к вирусу гепатита С (анти-HCV). По данным лабораторного обследования, выявлена тромбоцитопения ($140 \times 10^9/\text{л}$), синдром цитолиза: АЛТ — 3,5N, АСТ 3N, холестаза (ГГТП — 7N). По данным УЗИ: гепатоспленомегалия, диффузные изменения печени и поджелудочной железы. В результате проведенного молекулярно-биологического исследования в сыворотке крови выявлена высокая вирусная нагрузка HCV — $1,32 \times 10^6$ МЕ/мл, генотип 1b. Пациенту был назначен курс противовирусной терапии: ПегИФН-2а в дозе 180 мкг/нед в сочетании с Рибавирином в суточной дозе 1200 мг. К 12-й неделе от начала противовирусной терапии наблюдалось снижение вирусной нагрузки свыше 2lg, без достижения биохимической ремиссии. В связи с отсутствием вирусологического ответа на 24-й неделе терапии было рекомендовано прекращение противовирусной терапии в связи с её неэффективностью.

Пациент продолжал наблюдаться у инфекциониста по месту жительства. В 2011 г. он отметил ухудшение общего самочувствия, усиление проявлений астеновегетативного синдрома. При обследовании установлено: увеличение выраженности синдромов цитолиза (АЛТ — 5N, АСТ — 7N), холестаза (ГГТП — 8N), повышение вирусной нагрузки HCV в сыворотке крови: $1,93 \times 10^7$ МЕ/мл. В результате проведенной эластографии печени была выявлена цирротическая стадия заболевания (F4 по METAVIR: 21,3 кПа).

В связи с прогрессией ХГС было рекомендовано прохождение повторного курса ПВТ (ПегИФН-2b в дозе 15 мкг/кг/нед в сочетании с Рибавирином в дозе 15 мг/кг/сут), в течение которого не наблюдалось достижения биохимической и вирусологической ремиссии. В период с 2011 г. по 2013 г. пациент продолжал наблюдение у инфекциониста по месту жительства, назначались гепатопротекторы.

В мае 2013 г. пациент обратился в Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова в клинику внутренних болезней и нефрологии (зав. кафедрой — д. м. н., профессор В. Г. Радченко) для проведения дополнительного обследования и лечения.

Гематологические исследования выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе «BECMAN-COULTER 5-diff» (Германия). Определяли морфологические характеристики клеток и их среднепараметрические размеры с построением гистограмм распределения клеток разных типов, СОЭ. Биохимическое исследование сыворотки крови проводили на автоматическом биохимическом анализаторе «Cobas Integra — 400 Plus» (Roch-Diagnostics, Швейцария) используя коммерческие наборы реактивов («Roch-Diagnostics», Швейцария), с определением уровней билирубина, АЛТ, АСТ, гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Серологические маркеры гепатитов гемоконтактной группы — HBsAg, HBeAg и антитела к вирусам HBeAb, HBcorIgM, HBcorIgG, HDVlgG, антитела к HCV (суммарные) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческой тест-системы III поколения (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Молекулярно-биологические исследования по идентификации HCV выполнялись в лаборатории генной инженерии ФГБУ НИИ Гриппа РАМН, Санкт-Петербург (зав. лабораторией — к.б.н. М.П.Грудинин). РНК HCV выделяли из сыворотки крови, используя набор реагентов Viral RNA Mini Kit (Qiagen), а из мононуклеарных клеток периферической крови (ПМК) — с помощью TRIzol LS (Invitrogen). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора Реверта-L (Амплисенс) со случайными праймерами. Вирусную нагрузку определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, используя коммерческий набор HCV-Монитор-FRT (Амплисенс). ПМК из цельной гепаринизированной венозной крови получали при центрифугировании образцов крови в градиенте плотности фиколл-урографин. Генотипирование вируса проводили, используя метод прямого секвенирования 5'UTR и NS5A областей генома с помощью ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

При комплексном обследовании пациента использовали следующие инструментальные методы: ультразвуковое исследование (УЗИ) печени, жёлчного пузыря и желчевыводящих путей, поджелудочной железы, селезёнки (Siemens Sonoline Antares); фиброгастродуоденоскопию (ФГДС) проводили, используя волоконный эндоскоп GIF Q10 (Olympus, Япония), эластометрию; рентгенологическое исследование органов грудной клетки проводили, применяя стандартное оборудование.

Объективно при поступлении пациента в стационар: состояние удовлетворительное, кожные покровы и видимые слизистые оболочки чистые, обычной окраски. Пульс 74 уд/мин, ритмичный, удовлетворительных качеств. АД 130 и 80 мм рт. ст. Тоны сердца ясные, ритмичные, соотношение тонов не изменено, границы сердца не расширены. В лёгких

дыхание жёсткое, хрипов нет. Частота дыхательных движений — 16 в минуту. Живот правильной формы, мягкий, при пальпации безболезненный. Печень выступала из-под края реберной дуги на 4 см, край плотно-эластической консистенции. Симптом Рагозы положительный, периферические отёки отсутствовали.

При проведении лабораторных исследований выявлено: тромбоцитопения ($143 \times 10^9/\text{л}$), ускорение СОЭ (30 мм/час), синдром цитолиза (АЛТ 1,5N, АСТ 2,5N), холестаза (ГГТП 8N), повышение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК — 125 ЕД), белково-синтетическая функция печени сохранена (альбумин 38 г/л, ПТИ 76%). Результаты серодиагностики на наличие гепатитов: HBsAg отриц., anti-HBeAg отриц., anti-HBeIgG отриц., anti-HCV положит. Молекулярно-биологическими методами установлена высокая вирусная нагрузка HCV-RNA в сыворотке крови: 1×10^7 МЕ/мл и периферических мононуклеарах: $1,35 \times 10^7$ МЕ/мл. Определён 1b генотип HCV-RNA в обеих средах. Исследование полиморфизма гена Интерлейкина-28В выявило наличие полиморфизма гена IL-28B (rs 8099917) — вариант G/G, (rs 12979860) — вариант T/T. Анализ двух основных однонуклеотидных замен в регионе, примыкающем к гену IL-28B — rs 12979660 (замена цитозина на тимин, C>T) и rs 8099917 (замена тимина на гуанин, T>G), обнаружил прогностически неблагоприятный генотип IL-28B, ассоциирующийся с низким ответом на терапию Пег-ИФН и рибавирином.

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови выявило снижение показателей клеточного иммунитета: снижение общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-киллеров, NK-клеток, снижение количества клеток с фенотипом CD3+CD25+, CD25+.

Исследование выраженности процессов ПОЛ и состояния ферментативного звена антиоксидантной системы выявило интенсификацию ПОЛ в периферических мононуклеарах и снижение активности супероксиддисмутазы и каталазы у пациента до лечения.

Исследование цитокинового статуса выявило снижение индуцированной способности периферических мононуклеаров продуцировать цитокины IL-1 β , IL-10, IFN- γ , что свидетельствовало о наличии вторичной иммунной недостаточности на фоне персистирующей виремии HCV.

Результаты УЗИ органов брюшной полости: выявлены диффузные изменения паренхимы печени по типу цирроза, гепатоспленомегалия, диффузные изменения поджелудочной железы, признаки хронического некалькулёзного холецистита, региональная лимфаденопатия, расширение воротной вены до 13 мм. Результаты фиброгастроуденоскопии: выявлена портальная гастропатия. Заключение эластографии печени: из 10 серий измерений плотности печени общий результат эластичности составляет 31,6 кПа, что соответствовало F IV ст. по METAVIR.

На основании жалоб, данных анамнеза, результатов проведённого лабораторно-инструментального обследования был установлен диагноз: хронический гепатит С (генотип 1b), минимальной степени активности с внепечёночной репликацией в периферических мононуклеарных клетках, цирротическая стадия, Child Pugh A; портальная гипертензия (гиперспленизм); портальная гастропатия; хронический билиарнозависимый панкреатит вне обострения; латентная печёночная энцефалопатия; вторичная иммунная недостаточность.

В данном клиническом случае на этапе планирования предстоящей лечебной стратегии имелись определённые трудности при наличии большого количества предикторов неблагоприятного ответа на стандартную противовирусную терапию как со стороны организма: мужской пол, возраст старше 45 лет, цирротическая стадия заболевания, неблагоприятный вариант полиморфизма гена IL-28B, синдром холестаза, так и со стороны вируса: неблагоприятный генотип (1b), высокая вирусная нагрузка, репликация вируса в периферических мононуклеарах, что нашло отражение в не-

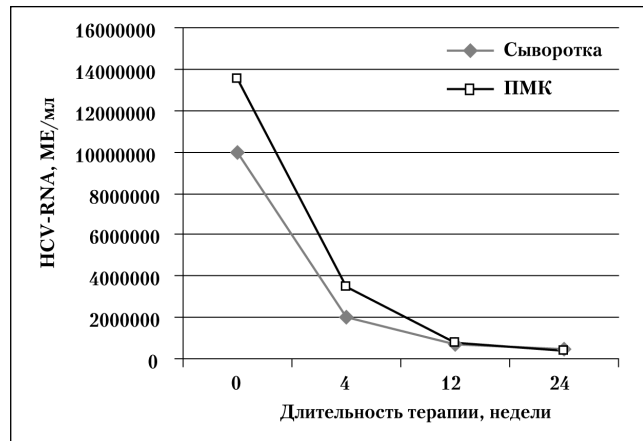


Рис. 1. Кинетика вирусной нагрузки HCV-RNA в сыворотке крови и периферических мононуклеарах (ПМК) на фоне безинтерфероновой схемы терапии (Циклоферон + Рибавирин).

эффективности двух предшествующих курсов комбинированной противовирусной терапии (ПегИФН + Рибавирин).

Учитывая наличие внепечёночной репликации HCV в периферических мононуклеарных клетках, неэффективность двух предшествующих курсов стандартной ПБТ (ПегИФН + Рибавирин), вторичную иммунную недостаточность (недостаточность моноцитарно-макрофагального звена, Т-лимфоцитарный иммунодефицит) на фоне хронической HCV-инфекции, цирротическую стадию заболевания, неблагоприятный генотип IL-B28, высокую вероятность осложнений при планировании трёхкомпонентной противовирусной терапии с применением ингибиторов протеаз, пациенту был назначен курс безинтерфероновой противовирусной и иммуномодулирующей терапии: интерферон-индуцирующая терапия циклофероном (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург) — 12,5% 4,0 мл внутримышечно на 1, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19-й дни, затем 3 раза в неделю в той же дозе в сочетании с нуклеотидным аналогом — рибавирином *per os* (1200 мг/сут) на протяжении 24 недель.

Для коррекции Т-лимфоцитарного иммунодефицита дополнительно вводился рекомбинантный IL-2 в дозе 0,5 мг внутривенно капельно в 400,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида с интервалом в 3—4 дня № 3 (3 курса в течение 24 недель). С целью коррекции антиоксидантной недостаточности в патогенетическую терапию был включён препарат из группы субстратных антигипоксантов — Ремаксол (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург), который вводился курсами (№ 4) внутривенно капельно по 400,0 мл в сутки в течение 10 дней.

К 4-й неделе от начала комбинированной терапии было достигнуто существенное снижение вирусной нагрузки в сыворотке крови и ПМК (рис. 1).

Через 12 недель от начала использования безинтерфероновой схемы лечения пациент отметил существенное улучшение общего самочувствия, уменьшилась выраженность астеновегетативного, диспепсического синдромов. При оценке биохимических показателей в динамике наблюдалось существенное снижение показателей синдрома холестаза (до 2N), цитолиза (до 1,2N).

Динамическое наблюдение за пациентом (по данным выполняемых в динамике клинико-биохимических, иммунологических, молекулярно-биологических методов исследования) позволило констатировать, наряду с улучшением биохимических показателей на протяжении всего периода наблюдения (24 недели), существенное снижение вирусной нагрузки HCV-RNA как в сыворотке крови, так и в периферических мононуклеарах, нормализацию уровня тромбоцитов,

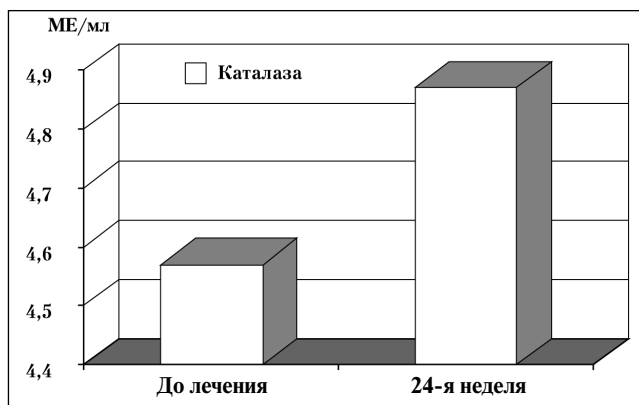


Рис. 2. Динамика ферментного звена антиоксидантной защиты сыворотки крови на фоне комбинированной этиопатогенетической терапии.

повышение активности ферментного звена антиоксидантной системы сыворотки крови (на фоне проведения метаболической коррекции ремаксолом) (рис. 2), уменьшение проявлений вторичной иммунной недостаточности (рис. 3).

Результаты и обсуждение

Данный клинический случай представляет собой ситуацию, обусловленную наличием у пациента, с одной стороны, большого количества неблагоприятных предикторов ответа на стандартную противовирусную терапию: мужской пол, возраст старше 45 лет, цирротическая стадия заболевания, неблагоприятный вариант полиморфизма гена IL-28B, вторичная иммунная недостаточность на фоне длительной HCV-инфекции, синдром холестаза; с другой стороны, факторы «вируса» — неблагоприятный генотип HCV (1b), высокая вирусная нагрузка, репликация HCV в периферических мононуклеарах, что нашло отражение в неэффективности двух предшествующих курсов комбинированной противовирусной терапии (ПегИФН + Рибавирин).

Наличие цирротической стадии заболевания у пациента Я. предопределяло, с одной стороны, неблагоприятный прогноз течения заболевания, а с другой — высокий риск развития нежелательных явлений при проведении последующих курсов ПВТ с включением пегилированных интерферонов в сочетании с ингибиторами протеаз.

Учитывая наличие многочисленных предикторов неблагоприятного ответа на ПВТ, вторичной иммунной, антиоксидантной недостаточности, неэффективность предшествующих курсов стандартной противовирусной терапии с применением пегилированных интерферонов, рибавирина, высокий риск развития тяжёлых нежелательных явлений при применении повторных курсов ПВТ с использованием рекомбинантных интерферонов, а так же учитывая естественную прогрессию заболевания и необходимость вторичной профилактики портальной гипертензии, необходимо переос-

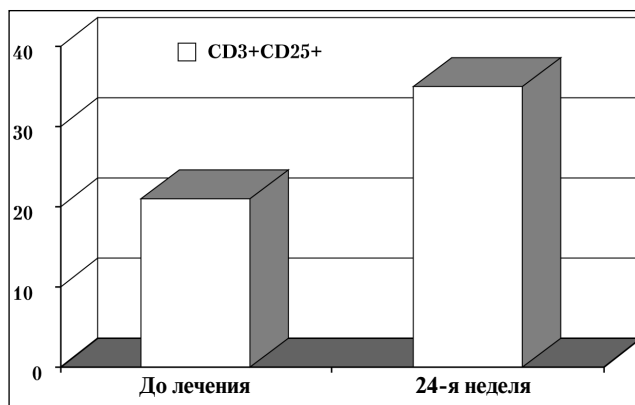


Рис. 3. Динамика активированных Т-лимфоцитов периферической крови на фоне комбинированной этиопатогенетической терапии.

мысление существующих терапевтических подходов применительно к пациентам с ХГС на цирротической стадии, не отвечающих на комбинированную интерферонотерапию. Представляется перспективным достижение оптимизации ПВТ путём включения в схему лечения препаратов патогенетической направленности — иммунокорректоров и антигипоксантов [25].

Углублённое изучение гистопатологических, клинических и иммунологических особенностей хронической HCV-инфекции позволило доказать существенную роль иммунных механизмов в патогенезе поражений печени [26—28]. У пациента Я. исходно выявлено наличие выраженной общей депрессии системы ИФН и Т-лимфоцитарный иммунодефицит. Применение комбинированной иммуномодулирующей терапии индуктором интерферогенеза в сочетании с рекомбинантным IL-2 способствовало усилению Т-клеточного звена иммунитета, восстановлению и повышению функциональной активности клеток-мишеней: НК-клеток, Т-лимфоцитов-хелперов, моноцитов, улучшению показателей системы эндогенного интерферона (рис. 4). Инфузионная терапия субстратным антигипоксантом с гепатопротективными свойствами Ремаксолом привела к повышению антиоксидантной составляющей сыворотки крови, улучшению функционального состояния печени.

Использование индукторов интерферогенеза для увеличения активного синтеза различными клетками интерферонов в условиях *in vivo* ранее было предложено нами как вариант альтернативного подхода к оптимизации терапии больных ХГС [29]. Используемые при лечении пациентов с ХГС индукторы интерферогенеза как лекарственные средства ориентированы на целевую установку увеличения уровня в организме эндогенных интерферонов, что имеет ряд преимуществ перед высокодозной, следовательно поликлональной, стиму-

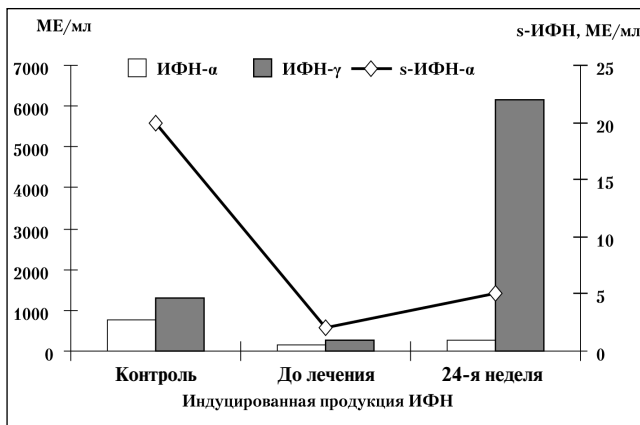


Рис. 4. Динамика показателей ИФН-статуса на фоне комбинированной этиопатогенетической терапии.

ляцией множества иммунореактивных клеток рекомбинантным интерфероном [17, 20, 22, 30]. Сочетанное применение препаратов индукторов интерфероногенеза и нуклеотидных аналогов способствует достижению эффекта синергизма в отношении к их противовирусной активности с сохранением иммунокорригирующего эффекта индукторов интерфероногенеза.

Изучение кинетики вирусной нагрузки HCV и совершенствование методов диагностики способствуют разработке современных схем лечения вирусного гепатита С с использованием индукторов интерфероногенеза.

Данный клинический случай демонстрирует эффективность комбинированной ПВТ: циклоферон + рибавирин, достижение частичного вирусологического ответа у пациента с циррозом печени в исходной стадии ХГС, генотипом 1b, не ответившего на два предшествующих курса стандартной ПВТ (ПегИФН + Рибавирин) с наличием предик-

торов неэффективности интерферонотерапии. Это диктует необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на оптимизацию противовирусной терапии пациентов с тяжёлым фиброзом/циррозом печени в исходе ХГС.

Выводы

1. При наличии длительно существующей хронической HCV-инфекции необходимо проведение углублённого лабораторного обследования с исследованием состояния Т-клеточного звена иммунной системы, параметров интерфероновой статус с целью определения показаний к назначению иммунокорригирующей терапии цитокиновыми препаратами (индукторами интерфероногенеза, γ -IL-2).

2. В описываемом клиническом случае комплексного лечения пациента с циррозом печени в исходе ХГС проведение комбинированной безинтерфероновой ПВТ (циклоферон + рибавирин) в сочетании с метаболическим корректором с гепатопротективными свойствами — Ремаксом и рекомбинантным IL-2 в течение 24 недель достигнут частичный вирусологический ответ (снижение вирусной нагрузки более чем на 2 log10 как в сыворотке крови, так и в периферических мононуклеарах), а также уменьшение выраженности Т-лимфоцитарного иммунодефицита и цитокинового дисбаланса на фоне хронической HCV-инфекции.

3. С целью вторичной профилактики прогрессирования ХГС у пациентов с продвинутой фиброзом/циррозом, не отвечающих на стандартную ПВТ с применением препаратов рекомбинантных интерферонов, необходимо осмысление существующих терапевтических подходов, разработка альтернативных безинтерфероновых схем этиопатогенетической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hanafinah K., Groeger J., Flaxman A., Wiersma S. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013; 57: 1333—1342.
2. Lozano R., Naghavi M., Foreman K. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012 Dec 15; 380 (9859): 2095—2128.
3. Bruno S., Stroffolini T., Colombo M., Bollani S. et al. Sustained virological response to interferon alpha is associated with improved outcome in HCV-related cirrhosis: a retrospective study. *Hepatology* 2007; 45: 579—587.
4. Gomez E., Rodriguez Y., Bertot L., Gonzales A. et al. The natural history of compensated HCV-related cirrhosis: a prospective long-term study. *Hepatology* 2013; 58: 434—444.
5. Sarrazin C., Berg T., Ross R.S., Schirmacher P., Wedemeyer H., Neumann U. et al. Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis C virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection. *J Gastroenterol* 2010; 48: 289—351.
6. EASL: Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014; 60: 2: 392—420.
7. Manns M. P., McHutchison J. G., Gordon S. et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared to interferon alfa-2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001; 358: 958—965.
8. Fried M. W., Shiffman M. L., Reddy R. et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New Engl J Med* 2002; 347: 975—982.
9. Schaefer M., Schmidt F., Folwaczny C., Lorenz R., Martin G., Schindlbeck N. et al. Adherence and mental side effects during hepatitis C treatment with interferon alfa and ribavirin in psychiatric risk groups. *Hepatology* 2003; 37: 443—445.
10. Шифф Ю. П., Корпел М. Ф., Мэддрей У. С. Болезни печени по Шиффу. Вирусные гепатиты и холестатические заболевания. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010; 408.
11. Shepherd J., Brodin H., Cave C., Waugh N., Price A., Gabbay J. Pegylated interferon alpha-2a and -2b in combination with ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2004; 8: 1—125.
12. Fried M., Shiffman M., Reddy K. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New Engl J Med* 2002; 347: 13: 975—982.
13. Asselah T., Marcellin P. Second-wave IFN-based triple therapy for HCV genotype 1 infection: simeprevir, faldaprevir and sofosbuvir. *Liver Int* 2014; 34: Suppl 1: 60—68.
14. Berenguer M., Lopez-Labrador F. Boceprevir in the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Virus Adapt Treat* 2011; 3: 7—17.

15. Zeuzem S., Andreone P., Pol S., Lawitz E. et al. Telaprevir for retreated of HCV infection. *New Engl J Med* 2011; 364: 25: 2417—2428.
16. Jacobson I., McHutchison J., Dusheiko G., Di Bisceglie A.M. et al. ADVANCE Study Team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *New Engl J Med* 2011; 364: 25: 2405—2416.
17. Козлов В.К., Стельмах В.В., Радченко В.Г. Хронический гепатит С: иммунопатогенез, аспекты диагностики и современная стратегия комплексного лечения. Руководство для врачей. СПб.: 2009; 170.
18. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009; 29: 74—81.
19. Стельмах В.В., Некрасова А.С., Козлов В.К., Радченко В.Г. Способ диагностики цирротической стадии хронического вирусного гепатита С. Приоритетная справка №2014133931 (054778).
20. Козлов В.К., Стельмах В.В., Радченко В.Г. Оптимизация этиопатогенетической терапии хронического гепатита С: Руководство для врачей. СПб.; 2004.
21. Стельмах В.В., Козлов В.К., Радченко В.Г. Рациональная терапия хронического гепатита С. Альтернативные возможности. *Врач* 2006; 2: 57-62.
22. Еришов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. М.: Медицина, 1996.
23. Волчек И.В., Сологуб Т.В. и др. Индивидуальная терапия вирусных гепатитов препаратами цитокинов и их индукторов. Цитокины и воспаление. 2002; 1: 2: 109.
24. Романцов М.Г., Сологуб Т.В. и др. «Тройная терапия» хронического вирусного гепатита С у пациентов с генотипом 1b. *Врач* 2006; 7: 53—57.
25. Стельмах В.В., Козлов В.К., Радченко В.Г. Метаболические корректоры на основе янтарной кислоты как средства патогенетической терапии при хронических вирусных гепатитах. *Терапевтический архив* СПб.: 2011; 2: 67-71.
26. Иммунологические предикторы эффективности лечения при хроническом гепатите С и пути оптимизации терапии. Материалы Всероссийской научной конференции «Лабораторная диагностика в фундаментальной и клинической медицине», посвященной 175-летию со дня рождения А.Я. Данилевского Санкт-Петербург, 27-28 ноября 2013; 58-59.
27. Субпопуляционный состав лимфоцитов у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С, не ответивших и ответивших на стандартную противовирусную терапию. Актуальные вопросы внутренних болезней ГБОУВПО СЗГМУ им. И. И. Мечникова: сб. трудов 15-й науч.-практ. конф. СПб.: 2014; 79-81.
28. Стельмах В.В., Козлов В.К., Суханов Д.С., Скипский И.М. Васкулит легких как клиническая «маска» HCV-инфекции: эффективность безинтерфероновой противовирусной терапии. *Терапевтический архив* 2014; 11: 93—98.
29. Козлов В.К. Ронколейкин: биологическая активность, иммунокорригирующая эффективность и клиническое применение. Справочник по иммунотерапии для практических врачей. СПб.: Диалог, 2002; 166—197.
30. Lauer G.M., Walker B.D. Hepatitis C virus infection. *New Engl J Med* 2001; 345: 41—52.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Стельмах Виктория Валерьевна — к. м. н., доцент, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, кафедра внутренних болезней и нефрологии, Санкт-Петербург

Козлов Виктор Константинович — профессор, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, кафедра клинической лабораторной диагностики, Санкт-Петербург; Санкт-Петербургский государст-

венный университет, кафедра челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии, Санкт-Петербург; Университет им. Ярослава Мудрого, кафедра микробиологии, иммунологии и инфекционных болезней, Великий Новгород

Некрасова Анна Сергеевна — аспирант, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, кафедра внутренних болезней и нефрологии, Санкт-Петербург

Морские бурые водоросли — источник новых фармацевтических субстанций антибактериальной направленности

Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹, Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА²

¹ ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

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

Brown Seaweeds as a Source of New Pharmaceutical Substances with Antibacterial Action

N. N. BESEDNOVA, T. A. KUZNETSOVA, T. S. ZAPORozHETS, T. N. ZVYAGINTSEVA

G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

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

В настоящее время рост антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных болезней к противомикробным препаратам обуславливает необходимость поиска новых антимикробных субстанций с улучшенными фармакологическими свойствами и новыми механизмами действия, к которым у микроорганизмов не формируется устойчивость. Такой поиск идет по трём направлениям: выделение новых веществ из природных объектов, в том числе из гидробионтов; химическая модификация молекул известных антибиотиков; поиск соединений с антимикробной активностью из числа новых химических структур, не имеющих аналогов в живой природе. Настоящий обзор посвящён антибактериальной, антивирусной и антигрибковой активности сульфатированных полисахаридов (фукоиданов) и экстрактов бурых, красных и зелёных морских водорослей, а также антиоксидантным, противовоспалительным, иммуномодулирующим и антиэндотоксическим свойствам, способствующим усилению их антиинфекционного действия. С учётом этой активности фукоиданы являются перспективной основой для создания новых препаратов для лечения инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: полисахариды морских водорослей, фукоиданы, антибиотики, антимикробные субстанции

At present the increase of antibiotic resistance in infection agents to antimicrobial drugs requires discovery of new antimicrobial substances with improved pharmacological properties and novel mechanisms of action, to which microorganisms do not develop resistance. Three areas are of interest for the search: recovery of new compounds from natural objects, including aquatic organisms, chemical modification of the known antibiotic molecules, discovery of compounds with antimicrobial activity among some new chemical structures which have no analogues in nature. The review is mainly concerned with discussion of antibacterial, antiviral and antifungal activity of sulfated polysaccharides (fucoidans) and extracts of brown, red and green algae, as well as of antioxidant, antiinflammatory, immunomodulatory and antiendotoxin properties that contribute to their antiinfective action. Such an activity makes fucoidans promising as a basis for developing new drugs for therapy of infectious diseases.

Key words: polysaccharides from seaweed, fucoidans, antibiotics, antimicrobial substances.

В связи с ростом антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных болезней к противомикробным препаратам существует настоятельная необходимость поиска новых антимикробных малотоксичных или нетоксичных соединений с улучшенными фармакологическими свойствами и новыми механизмами действия, к которым у микроорганизмов не формировалась бы устойчивость. При этом поиск новых антимикробных субстанций идёт в трёх направлениях: выделение веществ природного происхождения; химическая модификация молекул известных антибиотиков и, наконец, поиск соединений с ан-

тимикробной активностью среди новых химических структур, как правило, синтетических, не имеющих аналогов в живой природе.

Следует отметить, что менее всего кандидатов в лекарственные препараты получают до настоящего времени из природных объектов, особенно из гидробионтов, хотя в литературе уже в течение нескольких десятилетий появляется большое количество работ, освещающих антибактериальную, антивирусную и антигрибковую активность метаболитов морских и пресноводных водорослей и беспозвоночных животных [1–3].

Настоящий обзор посвящён антибактериальным потенциям сульфатированных полисахаридов (фукоиданов) и экстрактов бурых, красных и зелёных морских водорослей. Эти гидробионты привлекают внимание ученых как неисчерпае-

© Коллектив авторов, 2015

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

мый и постоянно восполняемый источник разнообразных биологически активных веществ (БАВ).

Антимикробный потенциал экстрактов морских водорослей. В современной литературе, освещающей полезные свойства водорослей, огромное число работ посвящено исследованиям антибактериальных эффектов экстрактов макроводорослей и их компонентов [4]. Наибольшая антибактериальная активность присуща экстрактам бурых водорослей. Отмечают, что экстракты, полученные из водорослей рода *Rhodophyta* и *Phaeophyta*, обладают наиболее высокой антибактериальной активностью [5]. Есть сообщения о том, что экстракция органическими растворителями обеспечивает извлечение веществ с более высокой антимикробной эффективностью, чем водная экстракция. Антибактериальная активность присуща также морским и пресноводным микроводорослям [6, 7].

Широкое отражение в научной литературе получили результаты исследования эффективности различных методов получения экстрактов [5, 8, 9]. При этом нет единого мнения о наиболее эффективных экстрагентах и способах экстракции как по выходу антибактериальных продуктов, так и по спектру антимикробной активности. Нет единого мнения и о том, какие компоненты экстрактов обладают антибактериальным действием.

Антибактериальная активность экстрактов водорослей может колебаться в зависимости от сезона сбора гидробионтов [10, 11]. Например, J. S. Choi и соавт. [11] обнаружили, что наиболее высокая антибактериальная активность экстрактов *Ulva pertusa* в отношении *Gardnerella vaginalis* была отмечена для образцов водоросли, полученных с ноября до мая (как было в 2009 г.) или с декабря до мая (2008 г.), т. е. в зимние месяцы. Другие авторы [12] сообщили, что экстракты бурых и красных водорослей, собранные весной и осенью, ингибировали рост микроорганизмов, экстракты зелёных водорослей обладали таким действием, если гидробионты собирали в зимнее время.

Антибактериальные компоненты экстрактов водорослей могут обладать как бактериостатическим, так и бактерицидным действием [12]. A. Manilal и соавт. [13] определяют механизм антибиотического действия экстрактов как отношение минимальной бактерицидной концентрации (МБК) к минимальной подавляющей концентрации (МПК). Если отношение ≤ 2 , экстракт можно считать бактериостатическим или бактерицидным, если отношение ≥ 16 , экстракт оценивается как неэффективный. Высокие дозы антибактериальных соединений (например, 45 мг/мл), как правило, бактерицидны.

Антибактериальную активность или, наоборот, отсутствие таковой у экстрактов водорослей

объясняют также отсутствием мишеней в структурах тест-бактерий для различных действующих веществ, содержащихся в экстрактах, а также способностью бактерий изменять структуру их молекул [14]. Степень мутности взвеси *Staphylococcus aureus* при контакте с возрастающими концентрациями фракции с высоким содержанием углеводов позволяет определить МПК или МБК. Отсутствие мутности в пробирке со взвесью соответствует уровню МПК, которая находится между 40 и 42 мг/мл соответственно. Авторы делают заключение, что действующей является фракция с высоким содержанием сульфатированных (сульфаты — 6,3%) углеводов (76,6%). Авторы считают, что эта фракция блокирует образование клеточной стенки бактерий, индуцируя их гибель и лизис.

С антимикробным действием экстрактов водорослей ассоциируют различные выделяемые из них соединения. По химической природе они могут быть флавоноидами, которые повышают проницаемость внутренней мембраны бактерий и вызывают потерю мембранного потенциала микроорганизма; полисахаридами, ингибирующими гиалуронидазу; жирными кислотами и липидами, нарушающими клеточную мембрану микроорганизма; полифенолами, связывающимися с адгезинами, подавляющими активность ферментов и нарушающими целостность мембраны; гликолипидами, циклическими пептидами; N-гликозидами; сульфатированными полисахаридами; β -дикетонами; алкалоидами; каротиноидами; токсинами и пр. [15–17].

Экстракты каждого вида водоросли имеют индивидуальный спектр антибактериальной активности. При этом один и тот же вид водоросли, собранной в различных регионах Земного шара, может иметь свой спектр. Многие водоросли обладают в большей степени антибактериальной активностью по отношению к грамположительной, другие — к грамотрицательной микрофлоре. По мнению P. Arunachalam и соавт. [8], резистентность грамотрицательных микроорганизмов к антибактериальным субстанциям экстрактов обусловлена гидрофильностью внешней мембраны микроорганизмов липополисахаридной природы, которая является барьером для молекул антибиотических компонентов экстрактов. Мембрана связана с ферментами периплазматического пространства, способными разрушать молекулы, проникающие извне [18]. Грамположительные микроорганизмы такой мембраной не защищены. В то же время G. J. Christobel et al. [19] объясняют высокую чувствительность грамотрицательных микроорганизмов к водным экстрактам ряда водорослей тем, что в них присутствуют соединения фенольной природы, которые солибилизируют липополисахаридный слой клеточной стенки бактерий и делают его проницаемым для антимикробных субстанций.

Как правило, экстракты с антибактериальными свойствами обладают и антиоксидантным действием [20]. Обе активности могут быть обусловлены разными компонентами экстрактов: хлорофиллом, каротиноидами, свободными фенолами, фукоиданами, флоротаннином, жирными кислотами [21].

Исследование антибактериальной и антиоксидантной активности двух экстрактов водорослей — *Gelidiella acerosa* и *Haligra* spp. показало, что экстракт *G.acerosa* имеет значительную антиоксидантную активность, в то время как экстракт второй водоросли обладает антибактериальным действием по отношению к *S.aureus*, который часто бывает причиной пищевых токсикоинфекций. Авторы предлагают использовать комбинацию экстрактов для консервации пищевых продуктов. Антибактериальную и антиоксидантную активности экстрактов авторы связывают с высоким содержанием в них фенолов [5].

Экстракты водорослей обладают антибактериальной активностью даже в отношении микроорганизмов с множественной лекарственной резистентностью, которая является большой проблемой для здравоохранения, всё более усугубляющейся с каждым днём, поскольку новые эффективные антибиотики на фармацевтическом рынке появляются нечасто [22]. Антибиотикоустойчивые микроорганизмы являются частой причиной внутри- и внебольничных инфекций. В значительной степени это касается возбудителей туберкулёза, болезней мочевых путей, а также воспалительных заболеваний кишечника. В практике врачей часто встречаются метициллинорезистентные *S.aureus*, ванкомицинорезистентные *Enterococcus faecalis*, антибиотикоустойчивые *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*. В связи с этим заслуживают особого внимания исследования активности экстрактов морских водорослей в отношении микроорганизмов с множественной устойчивостью к антибиотикам [23].

Наиболее часто авторы в качестве тест-микробов используют в своих исследованиях микроорганизмы, вызывающие тяжёлые или длительно текущие патологические процессы: *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *E.faecalis*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp. и др. [24].

Значительную проблему, особенно для лиц юношеского возраста, представляет угревая сыпь, связанная с *Propionibacterium acnes*. В этой связи большой интерес вызывают результаты исследования J. S. Choi et al. [25], показавших, что метанольные экстракты 13 видов морских водорослей обладали ингибиторной активностью в отношении этого микроорганизма, четыре из них (*Eclonia cava*, *Eclonia curome*, *Ishige sinicola* и *Symphycladia latucula*) проявляли ингибиторное действие, более выраженное у первых двух видов. Зона подавления

роста *P.acnes* составила $6,3 \pm 0,8$ мм для *I.sinicola*, $8,8 \pm 0,8$ мм для *S.laticula* и $5,3 \pm 0,3$ мм для *E.cava*. Эритромицин, взятый в качестве положительного контроля, давал зону ингибирования роста бактерий размером 13 мм. Экстракты этих водорослей не оказывали токсического действия на клетки линии RAW 264.7. Экстракт водоросли *S.laticula* через 24 часа инкубации снижал жизнеспособность клеток на 55% — при дозе 200 мкг/мл и на 57% — при дозе 400 мкг/мл, что может быть связано с высоким содержанием бромфенолов. Важным моментом в действии вышеперечисленных экстрактов являются их противовоспалительные свойства. Многочисленные литературные источники свидетельствуют о том, что практически все экстракты водорослей и полисахариды, полученные из них, обладают противовоспалительным действием [26].

Этанольный экстракт водоросли *Halimeda macroloba* и водный экстракт водоросли *Sargassum bindery* также оказывали ингибирующее действие в отношении *Propionibacterium acnes* [27]. Зона ингибирования роста составила соответственно $10,67 \pm 1,04$ мм и $7,33 \pm 0,76$ мм. Как и в предыдущем случае, экстракты оказывали противовоспалительное действие, снижая интенсивность каррагинанового отёка лап у крыс. Обращает на себя внимание тот факт, что экстракты оказывали бактериостатическое действие не только на *P.acnes*, но и на *S.aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, которые часто сопровождают угревую сыпь.

Бактерии *Acne vulgaris* часто бывают устойчивы к лекарственным средствам, в том числе и к антибиотикам. В связи с этим авторы считают, что поскольку водорослевые экстракты не обладают побочными эффектами и к ним не вырабатывается устойчивость микроорганизмов, они могут найти широкое применение в медицине для лечения пациентов с угревой сыпью.

Большое место среди трудно поддающихся лечению заболеваний ротовой полости, например, пародонтоза, кариеса и других, занимают патологические процессы, вызываемые бактериальной флорой. В связи с этим вызывает интерес сообщение L. Sujatha и соавт. [28], в котором авторы представили результаты исследования антимикробного действия экстрактов зелёных водорослей в отношении микроорганизмов, обитающих в ротовой полости — *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*. Наиболее чувствительными к экстрактам были *A.viscosus* (зона ингибирования составила $6,33 \pm 0,57$ мм). В качестве стандартного препарата был использован стрептомицин, с зоной ингибирования роста бактерий 11 мм. Экстракт водоросли *Ulva fasciata* подавлял рост всех тест-микробов. Авторы предлагают использовать эти экстракты для добавления в пищевые продукты, в жевательную резинку, а также для полоскания полости рта.

Одним из часто встречающихся возбудителей заболеваний, передающихся половым путем, является *G.vaginalis*. Y. M. На и соавт. [29] исследовали антибактериальную активность экстрактов 44 различных видов водорослей и обнаружили, что 61,4% из них обладали антибактериальной активностью в отношении этого возбудителя. Избирательную активность против этого микроорганизма проявил этанольный экстракт зелёной водоросли *Ulva pertusa* (зона ингибирования роста составила 11,3 мм при дозе экстракта 5 мг/диск). Положительным свойством этого экстракта является то, что он не вызывал угнетения роста или гибели лактобактерий влагалища. Авторы оценивают этот экстракт как потенциальную основу для создания натурального средства, которое может быть эффективным для лечения пациентов с бактериальным вагинозом.

Прямая антибактериальная активность сульфатированных полисахаридов морских водорослей. В настоящее время наибольший интерес среди индивидуальных соединений, выделяемых из бурых водорослей, вызывают фукоиданы — семейство структурно разнообразных сульфатированных полисахаридов, в состав которых обязательно входят остатки α -L-фукозы. Ряд бурых водорослей синтезируют α -L-фуканы, в которых остатки α -L-фукозы связаны 1,3- либо чередующимися 1,3;1,4-гликозидными связями. Довольно часто из бурых водорослей выделяют галактофуканы, построенные из остатков L-фукозы и D-галактозы. Содержание и положение остатков галактозы в галактофуканах значительно различается в зависимости от вида бурой водоросли. Это наиболее структурно разнообразная группа фукоиданов. Некоторые бурые водоросли синтезируют фукоманноуронаны. В настоящее время это самая немногочисленная группа фукоиданов. Помимо этого имеются в бурых водорослях фукоиданы, построенные из остатков фукозы, галактозы, ксилозы, маннозы и других, более редко встречающихся моносахаридных остатков. Структура фукоиданов может определять специфичность их биологического действия [30, 31].

Антибактериальные свойства фукоиданов обнаружены давно и изучаются достаточно интенсивно. Фукоиданы могут оказывать прямое бактериостатическое и бактерицидное действие в отношении различных микроорганизмов, патогенных для человека и животных [14, 32]. При этом эффект зависит также от вида водоросли, метода получения фукоидана, химического состава полисахарида, количества сульфатов. При исследовании прямой антибактериальной активности фукоидана из бурой водоросли *Sophora wightii* было установлено, что полисахарид содержал 52,86 $\pm$ 0,64% фукозы и 29,26 $\pm$ 0,83% сульфата. Авторы проверили антибактериальную актив-

ность полисахарида к 8 микроорганизмам, патогенным для человека. Наиболее чувствительным к фукоидану оказался холерный вибрион, зона ингибирования которого составила 18,6 $\pm$ 0,32 мм (тетрацилин, использованный в качестве положительного контроля, давал зону ингибирования 22 $\pm$ 0,36 мм). Минимальная подавляющая концентрация фукоидана в отношении этого возбудителя составила 31,25 мкг/мл, а минимальная бактерицидная концентрация — 62,5 мкг/мл. Если говорить о возможности применения в дальнейшем фукоидана при различной инфекционной патологии у человека, то следует иметь в виду, что этот полисахарид не токсичен и кроме антибактериального обладает и другими положительными эффектами (иммуномодулирующим, противовоспалительным, противоопухолевым, антиэндотоксическим и пр.). Кроме того, к этому полисахариду не формируется привыкания.

В работе A. Kantachumroo [33] представлены результаты изучения антибактериальной активности неочищенных полисахаридов из 7 видов бурых водорослей. Экстракцию проводили горячей дистиллированной водой при 100°C в течение 2 часов (E1-фракция). Фракцию E2 получали горячей экстракцией кислотой, при этом выход зависел от вида водоросли. То же можно сказать о содержании общих углеводов, а также сульфатов. Основным компонентом в обоих образцах была фукоза. Авторы отмечают, что только *Candida albicans* была слабочувствительна к полисахаридам. Обращает на себя внимание тот факт, что неочищенный полисахарид с высоким содержанием сульфатов не ингибировал тестируемые микроорганизмы, но наоборот стимулировал их рост. Это может быть объяснено высоким содержанием углеводов в неочищенном полисахариде, что создает ресурс углерода и способствует росту тест-микробов.

C. Sebaaly и соавт. [34] выделили из красной водоросли рода *Corallina* два сульфатированных полисахарида — галактан и каррагинан — и исследовали их антибактериальную и антикоагулянтную активности. Было установлено, что каррагинан оказывал более выраженные антикоагулянтные свойства, чем галактан. Антибактериальная активность биополимеров также различалась. Сульфатированный галактан оказывал как бактериостатическое, так и бактерицидное действие на два грамположительных микроорганизма — *E.faecalis* и *S.epidermidis*. Каррагинан, который относился к ламбда типу, лишь ингибировал рост *S.epidermidis* (МПК — 3,125 мг/мл). Оба полисахарида не оказывали действия на рост грамотрицательных микроорганизмов (*E.coli* и *P.aeruginosa*). Очевидно, что специфичность биологического действия связана со структурными особенностями этих полисахаридов.

Сульфатированные полисахариды, полученные из морских водорослей, в ряде случаев могут содержать контаминанты, в частности полифенолы и эндотоксины [35]. Авторы использовали в работе коммерческий фукоидан из водоросли *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich, США) и показали, что он дозозависимо (0—1000 мкг/мл) и видоспецифично ингибировал рост *Vibrio alginolyticus*. Однако антибактериальная активность препарата снижалась после экстрагирования метанолом. При этом метанольный экстракт был токсичен для культуры клеток RAW 264.7 и U937 и индуцировал морфологические апоптотические изменения в ядрах клеток U937. Это означает, что антибактериальная активность коммерческого фукоидана может быть частично обусловлена контаминантами, которые могут быть токсичными для клеток. По отношению к *E.coli* и *S.aureus* коммерческий фукоидан проявлял низкую активность, но эти микроорганизмы были более чувствительны к метанольному экстракту. После диализа коммерческого фукоидана через пористую мембрану (MVCO; 6000—8000) против дистиллированной воды в течение трёх дней препарат был высушен, и при этом не потерял своей активности. Возможно, антибактериальные соединения в препарате коммерческого фукоидана прочно связаны с молекулой полисахарида. После обработки фукоидана при 121°C в течение 30 мин значимого снижения антибактериальной активности не наблюдалось. Эти данные свидетельствуют о том, что антибактериальные компоненты коммерческого фукоидана были термостабильны и имели низкую молекулярную массу. Авторы отмечают, что фенольный компонент составлял 1% от общей массы метанольного экстракта.

Следует заметить, что в зарубежных странах широко распространена продажа фукоидана в различных вариантах и с разными назначениями через интернет. Вполне возможно, что в некоторых биопрепаратах есть примеси, которые могут оказывать токсическое действие на организм. В связи с этим требуется предварительная тщательная очистка фукоидана, предназначенного для реализации населению, во избежание нежелательных побочных эффектов.

Антиоксидантный потенциал фукоидана и его роль в уничтожении возбудителей инфекций. К сожалению даже в научных исследованиях часто используют неохарактеризованные и неочищенные препараты фукоиданов. Из анализа литературных данных следует, что антибактериальная активность фукоиданов равно, как и другие активности, могут быть полностью или частично обусловлены примесными соединениями, часто достаточно прочно связанными с молекулами полисахарида. Бурные водоросли синтезируют разные количества фукоиданов — от десятых долей процента до 20—

25%. Структура фукоиданов, синтезируемых разными видами водорослей, также значительно различается. В связи с этим схемы выделения и очистки фукоиданов могут быть различны и определяться содержанием и структурой сульфатированных полисахаридов. Наиболее предпочтительны схемы, включающие предобработку водоросли растворителями, с помощью которых извлекается большая часть вторичных метаболитов и других УФ-поглощающих соединений [36]. Именно эти соединения согласно литературным данным являются мощными антиоксидантами. Имеются данные, что очистка фукоиданов от примесей УФ-поглощающих веществ приводит к потере антиоксидантной активности [37].

Отделение фукоиданов от примесей не всегда возможно, поскольку эти соединения часто образуют прочные комплексы с полифенолами, которые нельзя разрушить, не разрушив молекулы фукоиданов. Несмотря на факты, свидетельствующие о принадлежности антиоксидантной активности фукоиданов примесям, их антиоксидантное действие изучается достаточно интенсивно. При этом данные о степени очистки препаратов фукоиданов или о присутствии в них тех или иных примесей чаще всего отсутствуют.

Чувствительность грамотрицательных микроорганизмов к фукоиданам может быть связана с антиоксидантными потенциями биополимеров. ЛПС этих микроорганизмов выполняет важную структурную роль. Стабильность структуры мембраны обеспечивается двухвалентными катионами металлов, которые находятся в комплексе с ЛПС, поэтому удаление ионов металлов за счёт связывания их какими-либо хелатирующими агентами приводит к уменьшению стабильности внешней мембраны. Сульфатированные полисахариды, как свидетельствуют многочисленные сообщения, обладают антиоксидантными свойствами и способны хелатировать катионы металлов, что может приводить к уменьшению стабильности внешней мембраны и резкому снижению её барьерной функции, а также делает клетки бактерий более подверженными действию других антибактериальных веществ, которые неспособны проникать через неповреждённую мембрану. Обращает на себя внимание тот факт, что антибактериальные свойства фукоиданов в ряде случаев сочетаются с их антиоксидантным действием. Так, P. Vijayabaskar et al. [38] сообщили, что фукоидан из бурой водоросли *Sargassum swartzii* с м.м. 50 kDa проявил высокую антибактериальную активность в отношении 10 различных патогенных для человека микроорганизмов, наиболее чувствительной к полисахариду была *E.coli*. Антиоксидантная активность этого биополимера также была высокой. По-видимому, в данном случае может проявляться хелатирующий эффект

фукоидана, играющий роль в нарушении структуры стенки грамотрицательных бактерий.

Полисахариды водорослей препятствуют образованию микробных биоплёнок. Большой проблемой для здравоохранения является образование бактериями биоплёнок, которые представляют собой микробные сообщества, покрытые общим гликокаликсом — сложной полимерной структурой полисахаридной природы. При этом изменяется фенотип микроорганизмов, что выражается в изменении параметров роста и экспрессии специфических генов. Большая часть индивидуальных клеток в составе биоплёнки находится в состоянии покоя и характеризуется низкой чувствительностью к антибиотикам. Периодически в отдельных участках биоплёнки возникают очаги размножения, из которых в окружающую среду выделяются свободные (планктонные) микроорганизмы, сохраняющие фенотип исходной биоплёнки. За счёт способности синтезировать экзополисахаридный матрикс, плёнка чрезвычайно устойчива. Она эффективно предотвращает диффузию антимикробных средств и буферизирует изменения pH [39]. Бактерии в плёнке способны обмениваться генами резистентности, отвечающими за устойчивость к определённым антибиотикам.

По некоторым данным, свыше 60% всех внутрибольничных инфекций развивается в результате деятельности микроорганизмов, находящихся в биоплёнках [40]. Особого внимания требует проблема образования бактериальных биоплёнок на синтетических имплантатах. Это обстоятельство диктует необходимость поиска альтернативных средств борьбы с микробными сообществами.

Сульфатированные полисахариды, выделенные из природных объектов, в том числе из гидробионтов, обладают способностью препятствовать образованию биоплёнок [41]. Известно, что *Helicobacter pylori* может образовывать биоплёнку на поверхности слизистой желудка [42]. Полисахариды из водорослей *Chlorella* и *Spirulina* подавляли адгезию *H. pylori* к клеткам слизистой желудка и муцину *in vitro* и тем самым предотвращали колонизацию и образование биоплёнки [43]. Доказано, что образование биоплёнки *H. pylori* является важным фактором развития и устойчивости инфекции. Терапевтическое воздействие на биоплёнки может идти различными путями. Оно может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии бактерий к поверхности, блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией. Кроме того, оно может сочетаться с бактерицидными агентами (например, антибиотиками).

O. Rendueles et al. [41] обсуждают биологическую роль и потенциальное применение в медицине антиадгезивных полисахаридов, в том числе из

водорослей. Эти полисахариды могут подавлять образование биоплёнки или усиливать распад последней. Биополимеры конкурируют с бактериями и обеспечивают себе экологическое преимущество перед размножающимися микроорганизмами. Авторы считают антиадгезивные и антиплёночные полисахариды весьма перспективными для создания на их основе новых эффективных препаратов.

Таким образом, действие полисахаридов на бактериальные плёнки является ещё одним механизмом защитного действия этих соединений.

Антиадгезивное действие полисахаридов из морских водорослей. Другим аспектом антимикробного действия экстрактов и полисахаридов морских водорослей является ингибирование адгезии возбудителей к поверхности эукариотических клеток. Адгезия патогенных организмов к тканям хозяина необходима всем микроорганизмам для проникновения в восприимчивый организм и является непременным условием инициации большинства инфекционных болезней. Поэтому сегодня при изучении и создании антимикробных препаратов весьма перспективным и привлекательным является антиадгезивный эффект изучаемых веществ.

Контакт микроорганизма с клетками хозяина происходит путём молекулярных взаимодействий адгезинов микробной клетки (тонких субмикроскопических мультисубъединичных белковых придатков — фимбрий или пилей), которые нередко являются лектинами, с углеводными рецепторами поверхности тканей хозяина, в результате чего блокируется адгезия бактерий к клеткам эукариотов [44]. Лектиндефицитные мутанты часто лишены способности инициировать инфекционный процесс [44].

В основе поисков антиадгезивных препаратов лежит создание эффективных препятствий с разнообразными механизмами действия при установлении взаимодействий между лигандами и рецепторами. Одним из наиболее известных механизмов, с учётом которого осуществляется подбор ингибиторов процесса адгезии, является введение в систему «микроорганизм — эукариотические клетки» растворимых веществ, конкурирующих с лигандами или рецепторами за места связывания на клеточных поверхностях [45]. При этом все растворимые соединения можно разделить на две группы, способные реагировать или с возбудителем, или с эукариотической клеткой. Предпочтительнее избирательное связывание лигандов микроорганизма, так как оно в меньшей степени влияет на рецепторный аппарат клеток-мишеней, а через него — на самые разнообразные процессы в тканях макроорганизма.

Ингибиторами бактериальной адгезии *in vitro* являются поливалентные полисахариды, в том

числе сульфатированные полисахариды водорослей. Растворимые углеводы распознают поверхностные бактериальные лектины и блокируют адгезию бактерий к клеткам эукариотов. Следует обратить внимание на тот факт, что, как правило, ингибиторы адгезии не действуют бактериостатически или бактерицидно. Предполагают [44], что штаммы, резистентные к антиадгезивным соединениям, появляются значительно реже, чем антибиотикорезистентные.

Изучение молекулярной природы лиганд-рецепторных комплексов, образующихся при взаимодействии микроорганизмов с соответствующими им клетками-мишенями, а также факторов, влияющих на процесс адгезии *in vitro* и *ex vivo*, позволяет разработать профилактические меры, направленные на подавление ранних этапов инфекционного процесса [43, 46].

Применение природных или синтетических аналогов клеточных рецепторов и компонентов тканевых жидкостей способно значительно снизить, а в отдельных случаях и полностью предотвратить прикрепление микроорганизмов к клеткам хозяина.

Возможность использования углеводов для защиты от экспериментальных инфекций путём уменьшения степени адгезии микроорганизмов за счёт конкурентного взаимодействия была впервые показана в 1979 г. М. Aronson и соавт. [47]. Позднее с целью защиты от патогенов *in vitro* и *ex vivo* были исследованы различные биологически активные вещества вплоть до полисахаридов ягод, зелёного чая и пр. Из полисахаридов морского происхождения в качестве антиадгезивных биополимеров следует отметить хитозан [2], полисахариды из морских бактерий рода *Pseudoalteromonas* [48], а также сульфатированные полисахариды морских водорослей [32, 34].

Антиадгезивные свойства характерны практически для всех сульфатированных полисахаридов, как из наземных, так и из морских объектов, в том числе и для фукоиданов из бурых водорослей. Эти соединения эффективно ингибируют контакт патогенов различных таксономических групп с эукариотическими клетками. Сравнительно недавно [49] были синтезированы протяжённые фрагменты молекул фукоиданов, которые являются потенциальными ингибиторами адгезии микроорганизмов. Первая серия соединений состояла из ди-, тетра-, гекса-, окта-, додека- и гексадекасахаридов, построенных из (1→3) связанных остатков α -L-фукопиранозы, которые соответствовали структуре полисахаридов, выделенных из водорослей *Saccharina latissima* и *Chorda filum*. Вторая серия компонентов представляла собой ди-, тетра- и гексасахариды, построенные из (1→3)- и (1→4)- связанных остатков α -L-фукопиранозы, подобные фрагментам фуко-

иданов из бурой водоросли *Fucus evanescens*, *Fucus distihus* и др.

Большое число работ посвящено вопросу эрадикации *H. pylori* и снижения воспалительного процесса, вызванного этим возбудителем, с помощью сульфатированных полисахаридов из разных видов водорослей, поскольку они проявляют выраженное антиадгезивное действие и снижают интенсивность воспалительного процесса, подавляя образование провоспалительных цитокинов, продуцируемых клетками эндотелия слизистых. Так, в экспериментах *ex vivo* у мышей с гастритом, вызванным *H. pylori*, при добавлении фукоидана в питьевую воду наблюдалось ослабление симптомов болезни. Эффективность действия фукоиданов определяет, по-видимому, pH содержимого желудка. Установлено, что фукоидан из бурой водоросли *Cladosiphon ocamuranus* ингибировал прикрепление *H. pylori* к слизистой желудка свиней при pH 2,0 и 4,0, а два других фукоидана, использованных в этих экспериментах, подавляли прикрепление возбудителя только при pH 2,0. Несульфатированные полисахариды — декстран и маннан — не обладали способностью подавлять адгезию *H. pylori* [50]. Не ингибировали адгезию возбудителя к муцину карбоксилированные и десульфатированные полисахариды [51]. Другие авторы [52], работая с фукоиданом из этого же вида водоросли, показали, что возбудитель специфически узнаёт сфингогликолипиды, которые образуются сульфатированием остатков фукозы Levis b типа или H типа углеводных цепей и остатков галактозы, которые имеются на эпителиальных клетках желудка хозяина. Фукоидан, как полимер с сульфатной группой и антагонист фукозы, подавляет адгезию *H. pylori* к углеводной цепи. Авторы предполагают, что поверхность клетки *H. pylori* покрывается фукоиданом, в связи с чем возбудитель теряет способность к адгезии на слизистой, а симптомы гастрита при этом затихают. Методом иммуноблота показано, что слой белка на поверхности микроорганизма соединен с фукоиданом. Авторы обращают внимание на тот факт, что препараты с антиадгезивной активностью, в частности фукоиданы, следует вводить перорально.

Обсуждая вопрос об антиадгезивных свойствах полисахаридов водорослей, нельзя не остановиться на исследованиях M.F. Loke и соавт. [43], проведённых *in vitro* и *in vivo* с использованием полисахаридов из пресноводной водоросли *Spirulina*. В экспериментах *in vitro* был использован коммерческий («Sigma», США) муцин желудка свиней и *H. pylori*, адаптированный к мышам. Гелеобразный муцин MUC5AC служит первым рецептором *H. pylori* в желудке человека. Авторы вполне обоснованно полагают, что адгезия *H. pylori* обусловлена, главным образом, взаимо-

действием лектин-подобных молекул микроба с высокоспецифичными структурами муцина и клеточной поверхности. В связи с этим авторы считают, что углеводные компоненты являются идеальными кандидатами в антиадгезины, поскольку они эффективны и не вызывают привыкания, как антибиотики. Адгезия *H.pylori* к муцину желудка является необходимой для осуществления начального этапа колонизации и основой патогенеза. В связи с этим отмена адгезии может быть достаточно эффективной стратегией защиты от этой инфекции.

Синергизм действия сульфатированных полисахаридов с антибиотиками. Сульфатированные полисахариды, в частности фукоидан, могут действовать синергидно с антибиотиками. Так, К.У. Lee и соавт. [53] исследовали действие фукоидана *per se* и в комплексе с антибиотиком (гентамицин) для борьбы с кариогенными и периодонтотгенными бактериями ротовой полости. Установлено, что фукоидан может действовать на синтез клеточной стенки бактерий [14] и в комбинации с антибиотиком в дальнейшем может применяться как средство против кариеса, периодонтита и других заболеваний ротовой полости. Комбинация полисахарида с различными антибиотиками может действовать на ингибиторный эффект этих лекарственных средств. Так, например, при комбинации гентамицина с фукоиданом удалось снизить в 4 раза уровень МПК в отношении *Streptococcus criceti* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, и также в 4 раза уровень МБК в отношении *Streptococcus anginosus*, *A.actinomycetemcomitans* и *Prevotella intermedia*.

Этилацетатный экстракт бурой водоросли *Eisenia bicyclis* значительно уменьшал высокую резистентность *Candida* spp. к флуконазолу [54]. МПК флуконазола при комбинированном воздействии его с МПК экстракта (4 мг/мл) на *Candida* spp. снижалась от 64 до 4 мкг/мл. Это свидетельствует о синергизме действия компонентов экстракта и антибиотика и открывает перспективы получения из водорослей эффективных противогрибковых препаратов.

Вышеприведённые материалы свидетельствуют о том, что проблема синергидного действия существующих лекарственных препаратов антибиотиков и дериватов морских водорослей требует пристального внимания и углублённых исследований, так как это позволит найти подходы к совершенствованию терапии заболеваний, вызываемых бактериями и грибами.

Антиэндотоксические свойства сульфатированных полисахаридов. Эндотоксины или липополисахариды (ЛПС) являются одними из основных компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Попадая в организм, они вызывают ряд острых физиологических реакций — лихо-

радку, нарушения метаболизма, рассеянную внутрисосудистую коагуляцию; при больших дозах — некроз тканей, сильнейшую интоксикацию и смерть. Эти процессы являются результатом как прямого, так и опосредованного действия эндотоксина — ЛПС-индуцированных гуморальных и клеточных реакций. Отечественными [55, 56] и зарубежными [57] исследователями показана способность фукоиданов из водорослей оказывать антиэндотоксическое действие, в частности, подавлять индуцированную ЛПС гиперэкспрессию провоспалительных цитокинов. Этот эффект реализуется за счёт образования макромолекулярных комплексов с ЛПС. Токсический центр молекулы ЛПС — липид А представляет собой потенциальную мишень для соединений с антиэндотоксической активностью. Такими свойствами обладают каррагинаны. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлено, что каррагинаны способны взаимодействовать с ЛПС грамотрицательных бактерий, изменяя надмолекулярную организацию, что способствует снижению их токсичности [55].

Каррагинаны обладают высокой способностью связывать и удерживать ионы металлов, что имеет перспективы их использования в составе энтеросорбентов при заболеваниях, сопровождающихся эндотоксикозом [58].

Относительно антиэндотоксических свойств фукоиданов сведений в литературе меньше. Так, Е.Ж.Ко и Н.Г. Joo [57] установили, что профилактическое введение фукоидана из *F.vesiculosus* способствует увеличению выживаемости животных, получивших летальную дозу ЛПС *E.coli*, что рассматривается как воспроизведение модели сепсиса. Исследуя механизмы действия полисахарида, авторы установили, что фукоидан оказывает цитопротекторное действие, способствуя восстановлению популяции дендритных клеток, а также увеличению экспрессии антиапоптотических молекул Bcl-2, Bcl-xL, cIAP-1 на спленоцитах, в которых под влиянием ЛПС усиливались процессы апоптоза.

Углеводы подавляют связывание клеток с углеводспецифическими токсинами, как, например, токсином *Shigella dysenteriae* 1 типа, и гомологичным веротоксином *E.coli*, специфичным к галактобиозе [44].

Большую роль в инфекционной патологии играют болезни, ассоциированные с клостридиями. В этом случае также есть необходимость в новых терапевтических стратегиях. В связи с этим представляет интерес сообщение А.Р. Baretto et al. [59]. Авторы установили защитное действие фукоидана, блокатора Р-селектина, на развитие энтерита мышей, вызванного токсином А (25 мг/кг) клостридий. Полисахарид оказывал выраженное защитное действие ($p < 0,05$). Как показали гистопат-

тологические исследования, у животных, получавших фукоидан, отсутствовали повреждения слизистой кишечника. Введение полисахарида способствовало снижению активности индуцированной токсином А, миелопероксидазы и аденозиндеаминазы. Таким образом, фукоидан купировал разрушение ткани кишки и воспалительный процесс при экспериментальном энтерите мышей.

Перспективные исследования проведены Т. А. Кузнецовой [56], которая воспроизводила эндотоксемию путём введения мышам ЛПС *Yersinia pseudotuberculosis*. Автором было показано, что фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* повышает резистентность мышей к токсическому действию ЛПС псевдотуберкулёзного микроба, восстанавливает функциональную активность нейтрофилов, ингибирует повышенный уровень провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 α , IL-6), снижает степень микроциркуляторных нарушений и вторичных дистрофически-деструктивных изменений в паренхиматозных органах животных. Парентеральное и пероральное введение фукоидана при экспериментальной эндотоксемии оказывает корригирующее влияние на показатели системы гемостаза, предотвращая развитие или снижая интенсивность течения ДВС-синдрома. Полученные данные свидетельствуют о том, что при помощи фукоидана возможна реализация основных принципов лечения пациентов с эндотоксемией.

Заключение

Одним из первых свойств, обнаруженных у экстрактов водорослей и их компонентов стали антибактериальная и антимикотическая активности, которые в настоящее время активно осваиваются медициной, сельским хозяйством и пищевой промышленностью. Будучи нетоксичными или в редких случаях слаботоксичными для клеток макроорганизма, компоненты экстрактов различной химической природы, в том числе сульфатированные полисахариды, оказывают бактериостатическое или бактерицидное действие на широкий спектр условно-патогенных и патогенных для человека и животных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. К сожалению, механизмы антибактериального действия БАВ из водорослей на клеточном и молекулярном уровнях раскрыты далеко не полностью. Можно считать, что в настоящее время, в большей степени идёт скрининг антибактериальных веществ из гидробионтов, накопление знаний о них, исследуется спектр их антибактериальной, антимикотической и противовирусной активности, определяется эффективность различных методов экстракции, изучается характер влияния сезона и региона добычи водорослей на антимикробную активность экстрактов и их компонентов. В последние годы началось ак-

тивное изучение механизмов действия БАВ из водорослей, обладающих антимикробным действием, делаются попытки определить связь структуры соединений с их антимикробной активностью. Однако этот вопрос ещё требует глубокого изучения и накопления знаний, поскольку затруднения связаны с тем, что фукоиданы — гетерогенная группа веществ, различающихся по структуре, молекулярной массе, степени сульфатирования и пр.

Многочисленными исследованиями доказано, что как экстракты водорослей, так и сульфатированные полисахариды, полученные из них, обладают, кроме антибактериального, мощным антиоксидантным, противовоспалительным, иммуномодулирующим и антиэндотоксическим потенциалом, что не может не усиливать их антиинфекционное действие.

Осторожного подхода при определении антибактериального действия БАВ из гидробионтов требует адекватная экстраполяция данных, полученных *in vitro*, в область их применения *in vivo*, учитывая, что в настоящее время почти все исследования «морских антибиотиков» проводятся вне организма. Исследования *in vivo* действия их на клетки-эффекторы имеют ряд ограничений [60]. Главное из них — несоответствие концентрации препаратов, используемых *in vitro*, с воздействующими на клетки организма при экспериментальных инфекциях и, тем более, в условиях человеческого организма. В экспериментах *in vitro* практически не моделируется внутренний состав среды организма, отсутствуют важнейшие сывороточные факторы (иммуноглобулины, система комплемента и пр.). При исследовании БАВ *in vitro* не учитывается возможное влияние метаболитов, образуемых в условиях целостного организма на иммунную систему.

До настоящего времени существуют разногласия по механизмам действия различных химических соединений с антибактериальным действием, получаемых из экстрактов водорослей. Сульфатированные полисахариды в этом плане изучены несколько лучше, но тоже требуют более детального изучения. Необходимо на современном методическом уровне исследовать взаимодействие этих соединений с грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами, ультраструктурную организацию бактерий после воздействия полисахаридов разной структуры, понять роль их антиоксидантных свойств в антибактериальном действии. Требуется уточнения вопрос о мишенях сульфатированных полисахаридов в бактериальной клетке (подавление синтеза клеточной стенки, синтез белка, нуклеиновых кислот или другие механизмы). Необходимо исследование транскрипционного профиля фукоиданов, сопоставления его с таковым эффективных классических антибиотиков.

Крайне мало исследованы антибиотические свойства наночастиц фукоиданов. Этот вопрос тоже требует серьёзных исследований, поскольку наночастицы взаимодействуют между собой и объектами окружающей среды иначе, чем макро-частицы, в чем и проявляются особенности их свойств [61].

Несмотря на все нерешённые вопросы, фукоиданы, сочетающие в себе высокий антибактериальный потенциал, антитоксические, противовоспалительные, иммуномодулирующие и антиоксидантные свойства, отсутствие формирования резистентности к ним у микроорганизмов, являются перспективной основой для создания новых препаратов для борьбы с разнообразными инфекциями. Многогранность действия этих соединений реализуется на кле-

точном и биохимическом уровне и является существенным фактором повышения антибактериального терапевтического потенциала БАВ из гидробионтов. Фукоиданы, в отличие от классических антибиотиков наземного происхождения, имеют много мишеней для своего действия, а их антибактериальный эффект является совокупностью нескольких возможных механизмов, приводящих микроорганизмы к гибели. Дальнейшие исследования экстрактов водорослей, их компонентов, а также фукоиданов, получаемых из этих гидробионтов, позволят определить подходы к разработке биотехнологии получения эффективных нетоксичных и экологически безопасных биоцидных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ДВО РАН П-42 «Дальний Восток».

ЛИТЕРАТУРА

1. Amorim R.N.S., Rodrigues J.A.G., Holanda M.L. et al. Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. Brazil Arc Biol Technol 2012; 56: 2: 71—81.
2. Liu X.L., Liu D.Y., Wang Y.Q. et al. Immunomodulation and antitumor activity of fucoidan from *Undaria pinnatifida* in vivo. Chin J Microecol 2010; 22: 2: 86—92.
3. Li C., Blencke H.M., Haug T. et al. Expression of antimicrobial peptides in coelomocytes and embryos of the green sea urchin. Development Comparat Immunol 2014; 43:1: 106—113.
4. Kolanjinathan K., Stella D. Antibacterial activity of marine macroalgae against human pathogens. Rec Res Sci Technol 2009; 1: 1: 20—22.
5. Devi K.N., Kumar T.T.A., Dhaneesh K.V. et al. Evaluation of antibacterial and antioxidant properties from brown seaweed *Sargassum wightii* against human bacterial pathogens. Int J Pharm Pharm Sci 2012; 4: 3: 143—149.
6. Abd El Baky H.H., El-Baroty G.S. Healthy benefit of microalgal bioactive substances. J Aquatic Sci 2013; 1: 1: 11—23.
7. Pradhan J., Das S., Das B.K. Antibacterial activity of fresh water microalgae: a review. Afr J Pharm Pharmacol 2014; 8: 32: 809—818.
8. Arunachalam P., Uthandakalai R., Rajsmail R. Evaluation of antibacterial activity of some selected green seaweed extracts from Muttam coastal areas, Kanyakumari, Tamil Nadu, Ind J Coastal Life Med 2014; 2: 2: 112—115.
9. Pushparaj A., Raubbin R.S., Balasankar T. An antibacterial activity of the green seaweed *Caulerpa sertularioides* using five different solvents. Int J Chem Tech Research CODEN (USA):IJPRIF. 2014; 6: 1: 1—5.
10. Имбе Т.И., Красовская Н.П., Ермакова С.П. и др. Сравнительное исследование химического состава и противоопухолевой активности водно-этанольных экстрактов бурых водорослей *Laminaria cichorioides*, *Costaria costata* и *Fucus evanescens*. Биол моря 2009; 35: 2: 140—146.
11. Choi J.S., Ha Y.M., Lee B.B. et al. Seasonal variation of antibacterial activities in the green alga *Ulva pertusa* Kjellman. J. Environment Biol 2014; 35: 341—344.
12. Salvador, N., Garreta A.G., Lavelli L., Ribera M.A. Microbial activity of Iberian macroalgae. Sci Mar 2007; 71: 1: 101—113.
13. Manilal A., Sujith S., Selvin J. et al. Antibacterial activity of *Falkenbergia hillebrandii* (Born) from the Indian coast against human pathogens. Phyton 2009; 78: 161—166.
14. Pierre G., Sopena V., Juin C. et al. Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. Biotechnol Bioproc Engineer 2011; 16: 937—945.
15. Amaro H.M., Malcata F.X. Carotenoids from microalgae and cyanobacteria: features, production and applications. In: Masayoshi Yamaguchi (Ed.). Carotenoids: Properties, Effects and Diseases. Biochemistry Research Trends. Nova Sci Publish 2011; Chapter: 59—74.
16. Desbois A.P., Smith V.J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 85: 1629—1642.
17. Shoubaky G.A.E., Salem E.A.E.R. Active ingredients of fatty acids as an antibacterial agent from the brown algae *Padina pavonica* and *Hormophysa triquetra*. J Coastal Life Med 2014; 2: 7: 535—542.
18. Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D. and Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb. International J Food Microbiol 2007; 117: 112—119.
19. Christobel G.J., Lipton A.P., Aishwaria M.S. et al. Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of India. Seaweed Res Utiln 2011; 33: 1—2: 67—75.
20. Patra J.K., Rath S.K., Jena K. et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed (*Sargassum* spp.). Extract: a study on inhibition of glutathione-S-transferase activity. Turkish J Biology 2008; 32: 119—125.
21. Shanab S.M.M. Antioxidant and antibiotic activities of some seaweeds (Egyptian isolates). Int J Agricult Biol 2007; 9: 2: 220—225.
22. Silva G.C., Albuquerque-Costa R., Oliveira-Peixoto J.R. et al. Tropical Atlantic marine macroalgae with bioactivity against virulent and antibiotic resistant *Vibrio*. Lat Am J Aquat Res 2013; 41: 1: 124—130.
23. Manikandan S., Ganesapandian S., Singh M. et al. Antimicrobial activity of seaweeds against multidrug resistant strains. Int J Pharmacol 2011; 7: 522—526.
24. Al-Saif S.S.A., Abdel-Raouf N., El-Wazanani H., Aref I.A. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. Saudi J Biol Sci 2014; 21: 1: 57—64.
25. Choi J.S., Bae H.J., Kim S.J., Choi I.S. In vitro antibacterial and anti-inflammatory properties of seaweed extracts against acne inducing bacteria, *Propionibacterium acnes*. J Environ Biol 2011; 32: 313—318.
26. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Макаренко И.Д. и др. Противовоспалительные эффекты сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей. Успех соврем биол 2012; 132: 3: 312—320.
27. Boonchum W., Peerapornpisal Y., Kanjanapothi D. et al. Antimicrobial and anti-inflammatory properties of various seaweeds from the Gulf of Thailand. Int J Agricult Biol 2011; 13: 1: 100—104.
28. Sujatha L., Govardhan T.L., Rangaiah G.S. Antibacterial activity of green seaweeds on oral bacteria. Ind J Natur Product Resourc 2012; 3: 3: 328—333.
29. Ha Y.M., Choi J.S., Moon H.E. et al. Inhibitory effects of seaweed extracts on the growth of the vaginal bacterium *Gardnerella vaginalis*. J Environment Biol 2014; 35: 537—542.
30. Запорожец Т.С., Ермакова С.П., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н. Противоопухолевое действие сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей. В кн. Фукоиданы — сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства / Под ред. Беседнова Н.Н., Звягинцева Т.Н. Владивосток: Дальнаука, 2014; 294—310.
31. Vishchuk O.S., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. The fucoidans from brown algae of Far Eastern seas: antitumor activity and structure-function relationship. Food Chem 2013; 141: 2: 1211—1217.
32. Marudhupandi T., Kumar T.T.A. Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. Int Curr Pharm J 2013; 2: 10: 156—158.

33. Kantachumpoo A., Chirapart A. Components and antimicrobial activity of polysaccharides extracted from Thai brown seaweeds. *Kasetsart J Nat Sci* 2010; 44: 220—233.
34. Sebaaly C., Kassem S., Grishina E. et al. Anticoagulant and antibacterial activities of polysaccharides of red algae *Corallina* collected from Lebanese coast. *J App Pharm Sci* 2014; 4: 04: 30—37.
35. Nishiguchi T., Jiang Z., Ueno M. et al. Reevaluation of bactericidal, cytotoxic and macrophage-stimulating activities of commercially available *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Algae* 2014; 29: 3: 237—247.
36. Shevchenko N., Imbs T., Urvantseva A. et al. Method of processing seaweed. European Patent. 2005. WO2005/014657.
37. Imbs T.I., Skriptsova A.V., Zvyagintseva T.N. Antioxidant activity of fucose-containing sulfated polysaccharide obtained from *Fucus evanescens* using different extraction methods. *J Appl Phycol* 2015; 27: 1: 545—553.
38. Vijayabaskar P., Vaseela N., Thirumaran G. Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. *Chin J Natur Med* 2012; 10: 6: 421—428.
39. Миленин Д.О. Микробная биоплёнка *Helicobacter pylori* и её роль в патогенезе язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. *Фарматека* 2010; 20: 20—24.
40. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 4: 847—867.
41. Rendueles O., Kaplan J.B., Ghigo J.M. Antibiofilm polysaccharides. *Environ Microbiol* 2013; 15: 2: 334—346.
42. Cammarota G., Lanaro G., Bibbo S. et al. Culture-guided treatment approach for *Helicobacter pylori* infection: review of the literature. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 18: 5205—5211.
43. Loke M.F., Liu S.Y., Ng B.L. Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin. *FEMS* 2007; 50: 2: 231—238.
44. Sharon N. Carbohydrates as future antiadhesion drugs for infectious diseases. *Biochem Biophys Acta* 2006; 1760: 4: 527—537.
45. Krachler A.M., Orth K. Functional characterization of the interaction between bacterial adhesion multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands. *J Biol Chem* 2011; 286: 45: 38939—38947.
46. Парахонский А.П. Регуляция адгезии как способ профилактики инфекционного процесса. *Международ. Журн приклад фундаментал. исслед* 2009; 5: 126—127.
47. Aronson M., Medalia O., Schori L. et al. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl- α -D-mannopyranoside. *J Infect Dis* 1979; 139: 3: 329—332.
48. Смолина Т.П., Черных С.В., Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л. Снижение адгезии микроорганизмов на клетках уроэпителия с помощью полисахарида, выделенного из морских протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*. *Журн микробиол* 2006; 3: 58—61.
49. Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A. et al. Synthesis of large fucoidan fragments, potential inhibitors of microbial adhesion. 4th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates. 2010; September 19—22, FINLAND, Hyttälä, p. 50.
50. Shibata H., Iimuro M., Uchiya N. et al. Cladosiphon fucoidan against *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2003; 8: 59—63.
51. Hirno S., Utt M., Ringner M., Wadstrom T. Inhibition of heparin sulphate and other glycosaminoglycans binding to *Helicobacter pylori* by various polysulphated carbohydrates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 10: 301—306.
52. Masato Nagaoka, Hideyuki Shibata, Itsuko Takagi, Shusuke Hashimoto. Antibacterial agents and process for producing the same. Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2005/0130934 A1(19) United States.
53. Lee K.Y., Jeong M.R., Choi S.M. et al. Synergistic effect of fucoidan with antibiotics against pathogenic bacteria. *Arch Oral Biol* 2013; 58: 5: 482—492.
54. Kim K.H., Eom S.H., Kim H.J. et al. Antifungal and synergistic effects of an ethylacetate extract of the edible brown seaweed *Eisenia bicyclis* against *Candida* species. *Fish Aquat Sci* 2014; 17: 2: 209—214.
55. Ермак И.М., Барабанова А.О., Кукарских Т.А. и др. Природный полисахарид каррагинан как ингибитор токсического действия эндотоксинов грамотрицательных бактерий. *Бюлл экск биол мед* 2006; 141: 2: 191—193.
56. Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Somova L.M., Plekhova, N.G. Fucoidan extracted from *Fucus evanescens* prevents endotoxin-induced damage in a mouse model of endotoxemia. *Mar Drugs* 2014; 12: 886—898.
57. Ko E.J., Joo H.G. Fucoidan enhances the survival and sustains the number of splenic dendritic cells in mouse endotoxemia. *Korean J Physiol. Pharmacol* 2011; 15: 89—94.
58. Khotimchenko Y.S., Khotimchenko E.V., Khotimchenko M.Y. et al. Carragenans as a new source of drugs with metal-binding properties. *Mar Drugs* 2010; 8: 4: 1106—1121.
59. Baretto A.R., Cavalcante I.C., Castro M.V. et al. Fucoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A-induced ileal enteritis in mice. *Dig Dis Sci* 2007; 53: 4: 990—996.
60. Никитин А.В., Смолкина Т.В., Йорданова А.И. Противомикробные препараты как иммуномодуляторы биологической реактивности организма. *Антибиотики и химиотер* 2001; 46: 2: 33—36.
61. Qi L., Xu Z., Jiang X. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carb Res* 2004; 339: 2693—2700.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Беседнова Наталья Николаевна — Академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, e-mail: besednoff_lev@mail.ru

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д.м.н. руководитель лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова

Запорожец Татьяна Станиславовна — д.м.н., ВРИО директора НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова

Звягинцева Татьяна Николаевна — д.х.н., профессор, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.

ERCC1 как маркёр резистентности рака яичников к препаратам платины

Т. А. БОГУШ¹, А. С. ПОПОВА², Е. А. ДУДКО¹, Е. А. БОГУШ¹,
А. С. ТЮЛЯНДИНА¹, С. А. ТЮЛЯНДИН¹, М. И. ДАВЫДОВ¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина»
Российской академии медицинских наук, Москва

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

ERCC1 as a Marker of Ovarian Cancer Resistance to Platinum Drugs

T. A. BOGUSH, A. S. POPOVA, E. A. DUDKO, E. A. BOGUSH, A. S. TYULYANDINA, S. A. TYULYANDIN, M. I. DAVYDOV

N. N. Blokhin Russian Scientific Centre of Cancer, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

M. V. Lomonosov Moscow State University, Department of Fundamental Medicine, Moscow

Обзор посвящён важнейшему маркёру эксцизионной репарации нуклеотидов ERCC1 и его вкладу в резистентность рака яичников к препаратам платины. Рассмотрены все варианты лабораторного и клинического определения ERCC1 в ткани рака яичников (однонуклеотидные полиморфизмы гена ERCC1, уровень мРНК и белка). Систематизированы сведения о прогностической и предиктивной значимости ERCC1 в качестве маркёра эффективности платиносодержащей терапии рака яичников. Авторы обсуждают возможные причины разнородности результатов и подчёркивают необходимость унифицированного и интегрального подхода к исследованию ERCC1 в опухоли. Проанализированы работы, цитированные в поисковой системе Pub Med до января 2015 года.

Ключевые слова: рак яичников, ERCC1, эксцизионная репарация нуклеотидов, препарат платины, резистентность, прогноз.

The review is concerned with the crucial marker of nucleotide excision repair ERCC1 and its contribution to platinum resistance of ovarian cancer. All the variants of the laboratory and clinical ERCC1 assessment in the ovarian cancer tissue (single nucleotide polymorphisms of the ERCC1 gene, levels of mRNA or protein) are considered. Data on the prognostic and predictive value of ERCC1 as a marker of the response to platinum-based therapy in ovarian cancer are systematized. The authors discuss the possible causes of heterogeneity of the results and emphasize the necessity of a unified and integrated approach to evaluation of ERCC1 in the tumor. The publications cited in the Search Engine Pub Med up to January 2015 were analyzed.

Key words: ovarian cancer, ERCC1, nucleotide excision repair, platinum drug, resistance, prognosis.

Введение

Препараты платины цисплатин (цис-дихлордиаминплатина (II)) и его аналог карбоплатин (циклобутан-1,1-дикарбоксилатодиаминплатина(II)) в настоящий момент широко используются при лечении злокачественных опухолей различных локализаций, в том числе рака яичников. 75–80% случаев рака яичников полностью или частично отвечают на терапию первой линии [1, 2], в то время как остальные больные в течение шести месяцев после окончания лечения переживают рецидив заболевания. Таким образом, 20–25% пациенток получает заведомо неэффективную и токсичную терапию, которая ухудшает качество их жизни и нарушает режим лечения.

По данным фундаментальных исследований,

направленных на изучение возможных механизмов резистентности рака яичников к препаратам платины, важную роль играет активность системы репарации повреждений ДНК, в частности эндонуклеазы ERCC1-XPF, но клинические результаты противоречивы. В обзоре проведён анализ данных литературы, чтобы очертить круг проблем, обуславливающих неопределённость оценок клинической значимости ERCC1 в прогнозе резистентности рака яичников к препаратам платины и сформулировать возможные подходы к преодолению этой неопределённости.

Для того чтобы понять, почему ERCC1 является важнейшим предиктивным маркёром резистентности к платиносодержащим препаратам, ниже рассмотрен механизм их действия, а также принцип функционирования ERCC1.

Механизм действия препаратов платины

После внутривенного введения цисплатин прочно связывается с белками плазмы и быстро

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24.
Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН

проникает в ткани организма. Около 90% препарата в крови оказывается связанным с альбумином и другими белками плазмы, что приводит к инактивации большого числа молекул цисплатина. Попадая в клетку, молекулы воды замещают один или оба атома хлора в молекуле цисплатина, и, соответственно, образуются катионы $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$ и $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$. Эта реакция необходима для дальнейшего связывания цисплатина с ДНК [3]. В ДНК цисплатин преимущественно связывается с гуанином и аденином в N-7 положении [4], возможно из-за большей нуклеофильности этой позиции. В опытах на культурах опухолевых клеток показано, что цитотоксичность цисплатина коррелирует с образованием платиновых меж- и внутринитевых сшивок в молекуле ДНК [5, 6]. Эти сшивки нарушают структуру ДНК, ингибируют её репликацию, что, в конечном счёте, приводит к апоптозу клеток [7].

Карбоплатин имеет механизм действия сходный с цисплатином, но в исследованиях *in vitro* было показано, что для повреждения ДНК требуется большая концентрация первого препарата и более длительное время инкубации с ним по сравнению со вторым [8]. Ещё один препарат платины — оксалиплатин, в отличие от карбоплатина и цисплатина, вызывает образование структурно отличного аддукта, содержащего большую 1,2-диаминоциклогескановую группу [7].

ERCC1 — белок эксцизионной репарации нуклеотидов

Резистентность к препаратам платины считается многофакторным феноменом, в который вносят вклад сниженная внутриклеточная аккумуляция препарата, его инактивация сульфгидрильными группами белков плазмы и опухоли, повышенная репарация платиновых аддуктов в ДНК, а также несостоятельность механизма клеточной смерти. В зависимости от гистологического типа опухоли может быть экспрессирован один, два или даже все вышеупомянутые варианты резистентности [3, 9]. В ранних клинических исследованиях на культурах клеток рака лёгкого было показано, что устойчивость клеток к цисплатину связана с их повышенной способностью к репарации ДНК [10]. Повреждённая молекула ДНК может быть восстановлена системой репарации несоответствий, ДНК-зависимой протеинкиназой, но главная роль отводится системе эксцизионной репарации нуклеотидов.

Эксцизионная репарация нуклеотидов — это сложный клеточный процесс, устраняющий различные дефекты, нарушающие структуру ДНК. Он включает 4 этапа: 1) нахождение повреждения ДНК, 2) раскручивание спирали

ДНК, 3) вырезание повреждения эндонуклеазами и 4) ресинтез ДНК.

На первых двух этапах эксцизионной репарации нуклеотидов происходит поиск повреждений и раскручивание спирали ДНК. В этих процессах участвует ряд белков, результатом активности которых является подготовка фрагмента ДНК к действию нуклеаз — ферментов, участвующих в удалении дефектного участка.

Функцию вырезания повреждённого участка ДНК выполняет гетеродимер, состоящий из ERCC1 (excision repair cross complementing-group 1) и XPF (xeroderma pigmentosum group F). Этот комплекс разрезает цепь ДНК с 5'-стороны от повреждения. Надо заметить, что нуклеазной активностью обладает только домен XPF, который требует наличия ERCC1 для своей деятельности [11]. То есть, для работы данного комплекса необходима экспрессия двух этих белков. Кроме того, совместно с ERCC1-XPF в вырезании дефекта ДНК участвует ещё одна нуклеаза — ERCC5 (другое название — XPG). После этого происходит ресинтез и сшивание цепей ДНК при участии нескольких белков, в частности ДНК-полимераз и ДНК-лигаз.

Первые работы, показавшие, что система эксцизионной репарации играет существенную роль в устранении цисплатин-индуцированного повреждения ДНК, относятся к концу 1980-х годов [12]. Многие исследования были сфокусированы на нахождении и выяснении вклада каждого белка репарации в резистентность клеток опухоли к цисплатину. Первым клонированным геном, отвечающим за синтез белка репарации ДНК, является *ERCC1* [13], и уже тридцать лет ведутся активные исследования его структуры и функций.

Важность белков ERCC1 и XPF для восстановления структуры ДНК подтверждает тот факт, что мутации гена *XPF* приводят к заболеванию пигментной ксеродермой (xeroderma pigmentosum — XP), которая характеризуется повышенной чувствительностью кожи к воздействию солнечного излучения, что может привести к возникновению базально- или плоскоклеточного рака кожи после второго десятилетия жизни. В 2007 г. N. G. J. Jaspers и соотр. описали случай мутации гена *ERCC1*, которая привела к пре- и постнатальным дефектам развития [14], однако *ERCC1* не имеет номенклатуры «XP-х» как большинство факторов эксцизионной репарации [15].

Впервые предположение о том, что ERCC1 может играть роль предиктивного фактора резистентности клеток к препаратам платины, было высказано ещё в 1990-х годах [16]. Для изучения механизмов резистентности рака яичников к препаратам платины, в том числе и перекрёстной резистентности клеток опухоли к широкому диапазону алкилирующих агентов, большинство ав-

торов используют клетки рака яичников человека линии A2780 с разной степенью резистентности к препаратам платины, полученные путём отбора клеток при их культивировании в присутствии возрастающих концентраций цисплатина [17]. Так, в работе К. V. Ferry и сотр. представлены результаты определения уровня мРНК некоторых генов, ассоциированных с репарацией ДНК, в клетках родительской линии A2780 и в наиболее резистентной к цисплатину клеточной линии C200. Методом Нозерн блота показано, что единственным транскриптом, уровень которого был значимо увеличен в резистентных клетках по сравнению с родительскими, оказался ERCC1. При добавлении к клеткам очищенного белкового комплекса ERCC1-XPF эксцизионная активность клеток линии A2780 увеличивалась в 2,2 раза, а линии C200 — в 1,2 раза, что продемонстрировало роль гетеродимера в вырезании платиновых аддуктов из ДНК [18]. Показано также, что даун-регуляция или двойной нокаут комплекса ERCC1-XPF повышают цитотоксичность цисплатина. IC₅₀ цисплатина для клеток, мутантов по XPF и ERCC1, была приблизительно в 40 раз ниже по сравнению с клетками родительской линии, что указывает на ключевую роль этой нуклеазы в репарации цисплатин-индуцированного повреждения ДНК [19]. Подтверждают этот вывод и данные о том, что клетки с экспрессией других мутантных белков репарации — XPB, XPD и XPG, лишь незначительно более чувствительны к цисплатину, чем клетки родительской линии [20].

В одном из исследований с использованием клеточных линий немелкоклеточного рака лёгкого, рака яичников и молочной железы с разной чувствительностью к препаратам платины было показано, что во всех случаях уровень мРНК XPF приблизительно одинаков в отличие от уровня транскрипции ERCC1 — в чувствительных к цисплатину клетках он был существенно ниже по сравнению с резистентными. Помимо этого, нокаут гена ERCC1 привел к значительному уменьшению экспрессии XPF, но не наоборот [19]. Эти данные продемонстрировали возможность исследования ERCC1 в качестве самостоятельного маркера резистентности к платиновым препаратам.

ERCC1 и резистентность рака яичников к препаратам платины

Результаты клинических оценок предиктивной значимости ERCC1 в качестве маркера эффективности платиносодержащей химиотерапии рака яичников суммированы в таблице.

Наиболее изученным возможным механизмом изменения экспрессии ERCC1, индуцирующим резистентность опухолевых клеток к препа-

ратам платины, являются однонуклеотидные полиморфизмы в кодирующем участке гена ERCC1 (см. табл.). К наиболее распространённым относятся полиморфизмы в экзонах (кодон 118), а также в 3'-нетранслируемом регионе (C8092A) гена ERCC1. Анализ этих параметров в лейкоцитах периферической крови проведён в исследовании III фазы эффективности внутрибрюшинного против внутривенного способов введения цисплатина и паклитаксела, в котором приняли участие 233 женщины с раком яичников 3 стадии [21]. Методом прямого пиросеквенирования показано, что полиморфизм кодона 118 не связан с прогрессированием болезни и смертностью, что противоречит данным В. L. Qi и сотр., в работе которых выявлена прогностическая и предиктивная значимость полиморфизма кодона 118 (положительная корреляция с общей выживаемостью и продолжительностью безрецидивного течения болезни) [22]. В другом исследовании полиморфизм кодона 118 показал себя как предиктивный маркер ответа опухоли на платиносодержащую химиотерапию, но не как прогностический маркер [23]. И наконец, как полиморфизм в кодоне 118, так и средний или высокий уровни мРНК ERCC1, оказались связаны с увеличением риска прогрессирования заболевания (OR=1,95, $p=0,051$; OR=2,51, $p=0,009$; OR=2,41, $p=0,014$ соответственно) у пациенток, получавших монотерапию препаратами платины [24].

Противоречивы данные и о клинической значимости полиморфизмов региона C8092A (см. табл.). В работе Т. С. Krivak и сотр. показано, что пациентки с С/А или А/А генотипом имели больший риск прогрессирования заболевания (OR=1,44, 95% ДИ=1,06—1,94, $p=0,018$) и смерти (OR=1,50, 95% ДИ=1,07—2,09, $p=0,018$), при этом безрецидивная и общая выживаемость была на 6 и 17 мес соответственно ниже, чем у женщин с С/С генотипом [21]. Напротив, в исследовании К. М. Moxley и сотр. показано, что в случаях выявления генотипа А/А безрецидивная выживаемость на 16 мес выше, чем при генотипах А/С или С/С ($p=0,04$) [25]. В большом исследовании S. Marsh и сотр. после циторедуктивной операции пациентки получали карбоплатин в комбинации с таксанами. При изучении методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и пиросеквенирования 27 полиморфизмов в 16 ключевых генах, возможно влияющих на чувствительность клеток к таксанам (ABCB1, ABCC1, ABCC2 и др.) и к препаратам платины (ABCC2, ABCG2, ERCC1 и др.), не выявлено статистически значимых корреляций генотипа с исходом заболевания, а также с токсичностью [26]. Таким образом, результаты исследований однонуклеотидных полиморфизмов гена ERCC1 противоречивы и не позволяют сделать однозначное заключение

Методические подходы к оценке предиктивной значимости ERCC1 в качестве маркера эффективности платиносодержащей химиотерапии рака яичников

Автор, год, [ссылка]	Число пацие- нтов	Объект исследования		Метод исследования	Прогноз**			
					забо- лева- ния	эффе- ктивно- сти терап- ии		
I. Однонуклеотидные полиморфизмы кодона 118 (118) или региона C8092A (C8092A) гена ERCC1								
Kang S., 2006 [23]	60	кровь		ПЦР (SNapShot)	118	—	+	
Marsh S., 2007 [26]	869			ПЦР и пиросеквениро- вание	118	н/о	—	
	854				C8092A	н/о	—	
Krivak T., 2008 [21]	233				118	—	н/о	
		C8092A	+		н/о			
Smith S., 2007 [24]	178	опухоль	заморо- женные образцы	ПЦР (TaqMan)	118	—	—	
Bösmüller H., 2011[32]	41		парафи- новые блоки	ПЦР в реальном времени	118	н/о	—	
					C8092A	н/о	—	
118					—	—		
C8092A					+	—		
Moxley K., 2013 [25]	98	106	—*	ПЦР (SNapShot)	118	+	+	
Qi B.L., 2013 [22]	220				C8092A	—	—	
II. Уровень мРНК ERCC1								
Dabholkar M.,1994[27]	28	опухоль	замороже- нные образцы	ПЦР	с обратной транскрипцией	н/о	—	
DeLoia J., 2012 [1]	41					+	н/о	
Smith S., 2007 [24]	178				в реальном времени	—	—	
Bösmüller H., 2011[32]	41		парафи- новые блоки	ПЦР в реальном времени		н/о	—	
III. Уровень белка ERCC1								
Stadlmann S., 2008 [31]	59	опухоль	тканевые микро- чипы	иммуно- гистохими- ческий	клон антител	8F1	н/о	—
Steffensen D., 2009 [30]	101		парафи- новые блоки				н/о	+
Bösmüller H., 2011 [32]	41						н/о	—
Xie C., 2011 [29]	64						н/о	+
Rubatt J.M., 2012 [38]	408			FL297	—	н/о		
Muallem M., 2014 [39]	98		EPR7277	+	—			
Milovic-Kovacevic M, 2011[40]	55		заморо- женные образцы	вестерн блот	8F1	+	н/о	
DeLoia J.A., 2012 [1]	25				FL297	—	н/о	

Примечание. * — не указано в абстракте, полный текст статьи на китайском языке; ** «+» или «—» — наличие или отсутствие корреляция экспрессии ERCC1 с прогнозом заболевания или эффективностью химиотерапии; н/о — прогностическую или предиктивную значимость ERCC1 не оценивали.

об их клинической значимости в предсказании резистентности к препаратам платины. Скорее можно думать о том, что этот показатель неинформативен для ответа на поставленный вопрос.

Ещё один подход к оценке экспрессии ERCC1 — определение уровня мРНК ERCC1 в опухолевых клетках (см. табл., II). В одной из работ при исследовании 28 хирургических образцов рака яичников методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией или в реальном времени показано, что уровень экспрессии ERCC1 в 33% случаев чувствительной опухоли и в 70% — резистентной к платиносодержащей химиотерапии оказался выше среднего показателя по группе ($p=0,059$) [27]. В исследовании J. A. DeLoia и сотр. экспрессию ERCC1 по разным показателям оценивали методами ПЦР с обратной транскрипцией и вестерн-блота в хирургических образцах рака яичников 41 пациентки, которым проводили внутрибрюшинную платиносодержащую химиотерапию [1]. Оказалось, что ни однонуклеотидные полиморфизмы гена *ERCC1*, ни уровень мРНК не позволяют судить о количестве белка ERCC1 в опухолевых клетках, но высокий уровень экспрессии мРНК ERCC1 ($\geq 9,0$) коррелирует с более короткой безрецидивной ($p=0,040$) и общей выживаемостью ($p=0,006$). Увеличение уровня мРНК ERCC1 было связано также с увеличением на 26% риска прогрессирования (ОР=1,26, 95% ДИ=0,96—1,65, $p=0,093$) и на 73% — риска смерти (ОР=1,73, 95% ДИ=1,16—2,58, $p=0,007$). Возможно, что выявленное увеличение мРНК ERCC1, коррелирующее с худшим прогнозом, является маркёром активации в опухолях белка RAS, который ассоциирован с резистентностью к препаратам платины [1, 28]. Таким образом, определение мРНК ERCC1 не является надёжным предиктивным маркёром эффективности препаратов платины, что, возможно, обусловлено отсутствием однозначной связи между уровнем мРНК и экспрессией белка в клетке.

Для оценки экспрессии белка ERCC1 наиболее распространённым является иммуногистохимический (ИГХ) метод (см. табл.). С помощью этого метода с использованием антител к ERCC1 клона 8F1 показано, что частота выявления экспрессии ERCC1 в опухолях, резистентных к препаратам платины, значительно выше по сравнению с чувствительными — в 67% (19/28) и в 25% (9/36) случаев соответственно [29]. В методически идентичном исследовании ткани рака яичников (101 образец) получены сходные результаты: резистентность к платиносодержащей химиотерапии отмечена в 75% случаев с положительной и в 27% случаев с отрицательной экспрессией ERCC1 в опухоли ($p=0,0013$) [30]. Однако в аналогичном исследовании S. Stadlmann и сотр.,

включившем 80 образцов серозного рака яичников, корреляции между экспрессией белка и ответом на препараты платины обнаружено не было ($p=0,21$), при этом частота выявления экспрессии ERCC1 в опухолевых клетках оказалась довольно низкой — только в 20,3% случаев [31].

В исследовании Н. Bösmüller и сотр. (41 случай оптимальной циторедукции низкодифференцированного серозного рака яичников) экспрессию ERCC1 оценивали параллельно на генетическом уровне (ПЦР в реальном времени), по уровню мРНК (ПЦР с обратной транскрипцией) и по количеству белка (ИГХ анализ с антителами 8F1). Из анализа были исключены пациентки с опухолями «условно резистентными» (рецидив заболевания в период от 6 до 12 мес после окончания 6 циклов платиносодержащей химиотерапии). При этом ни экспрессия белка ERCC1 ($p=0,232$), ни однонуклеотидные полиморфизмы кодона 118 и C8092A гена *ERCC1* ($p=0,269$ и $p=0,543$), ни уровень мРНК ERCC1 ($p=0,896$) не показали связи с ответом на лечение [32].

Одной из причин расхождения результатов в представленных случаях иммуногистохимической оценки экспрессии ERCC1 могут быть отличия разных партий по активности и специфичности антител. Реальность такой интерпретации подтверждена в большом исследовании L. Friboulet и сотр. при ИГХ анализе ERCC1 в образцах немелкоклеточного рака лёгкого с использованием разных партий антител того же клона 8F1. Дискордантность результатов достигла 36% [33]. Более того, известно, что ген *ERCC1* в результате альтернативного сплайсинга образует 4 изоформы (201—204), биологические функции которых исследованы недостаточно. При этом в одной из последних работ показано, что антитела клона 8F1 выявляют все эти изоформы ERCC1 [34]. И наконец, недавно показано, что антитела 8F1 помимо ERCC1 выявляют ещё один антиген — холинфосфат-цитидилтрансферазу α , которая является ферментом синтеза фосфолипидов, регулируемым белком RAS, который ассоциирован с резистентностью к препаратам платины [1, 28]. Таким образом, антитела клона 8F1 не специфичны по отношению только к ERCC1 и, строго говоря, не подходят для проведения ИГХ анализа экспрессии этого белка в отличие от антител клонов FL297, 4F9 и EP2143Y [35—37].

В 2012 году опубликованы результаты работы с использованием одного из таких специфичных к ERCC1 антител — клона FL297 [38]. Экспрессия ERCC1 выявлена только в 27% исследованных образцов рака яичников. Пациентки с ERCC1-положительным и негативным статусом опухоли имели сходные показатели средней безрецидивной выживаемости (17,9 мес против 17,5

мес соответственно, $p=0,59$), общей выживаемости (52 мес против 47 мес соответственно, $p=0,30$), а также риска прогрессирования заболевания ($OR=0,90$, 95% ДИ: 0,71–1,15, $p=0,41$) и риска смерти ($OR=0,81$, 95% ДИ: 0,61–1,07, $p=0,14$). При этом экспрессия белка не коррелировала с одиночными нуклеотидными полиморфизмами в кодоне 118 и регионе C8092A гена [38].

В отличие от этого, в одном из последних исследований с антителами к ERCC1 клона EPR7277 общая выживаемость пациенток с раком яичников при низком или среднем уровне экспрессии ERCC1 оказалась выше, чем в случаях выявления высокого уровня белка в опухоли. Средняя общая выживаемость составила 21 и 28 мес против 15 мес ($p=0,048$ и $p=0,017$ соответственно). В то же время статистически значимого различия в безрецидивной выживаемости пациентов с разным уровнем экспрессии ERCC1 в опухоли после платиносодержащей химиотерапии выявлено не было [39]. Таким образом, введение в анализ новых антител не позволило улучшить результаты — заключения о клинической значимости ERCC1 остаются противоречивыми.

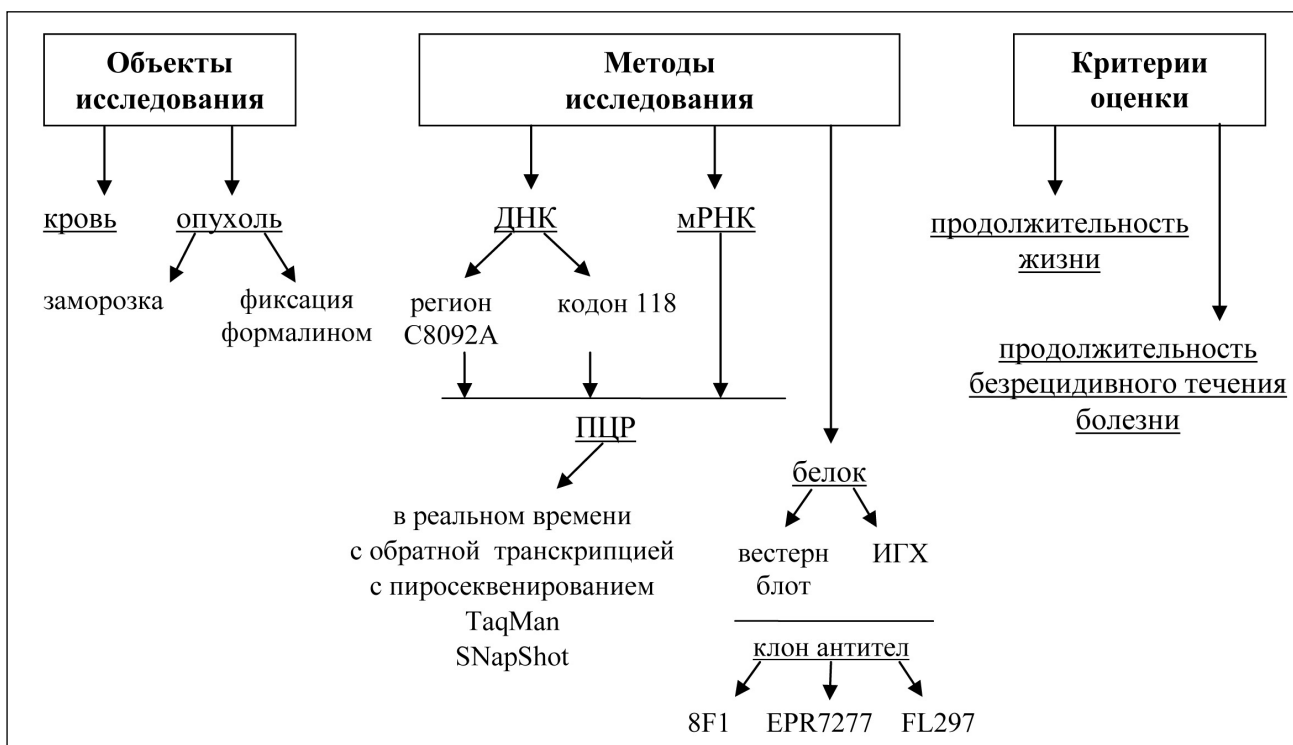
Тем не менее, если вновь обратиться к таблице и к работам, в которых оценивался показатель безрецидивной выживаемости, становится очевидным, что более надёжным предиктивным маркером, заслуживающим дальнейшего изучения, является белок ERCC1. Так, в 4 из 6 исследований однонуклеотидных полиморфизмов ДНК

гена ERCC1 и в 3 из 3 работ по оценке уровня мРНК ERCC1 не выявлено их предиктивной значимости. В то же время, в 2 из 4 исследований при ИГХ оценке экспрессии ERCC1 с антителами 8F1 и в работе с использованием антител этого же клона и проточной цитофлуориметрии показана корреляция молекулярного показателя опухоли с продолжительностью безрецидивного течения болезни, то есть значимость ERCC1 в прогнозе эффективности платиносодержащей химиотерапии рака яичника.

Заключение

Результаты фундаментальных исследований показали, что белок эксцизионной репарации нуклеотидов ERCC1 играет важнейшую роль и является необходимым звеном в репарации повреждений ДНК, вызванных препаратами платины. Это безусловный факт, который, однако, до настоящего времени не нашёл практического применения. Анализ клинических данных отчетливо демонстрирует, что противоречивость результатов разных авторов является следствием отсутствия общего алгоритма исследований. Эта «многоликая» несогласованность исследователей при оценке клинической значимости ERCC1 как предиктивного маркера резистентности к препаратам платины представлена на рисунке.

Прежде всего — материал исследования. Это не только опухоль, но и клетки крови [21, 23, 26].



Разнообразие подходов к оценке клинической значимости белка эксцизионной репарации ERCC1 как предиктивного маркера эффективности платиносодержащей химиотерапии рака яичников.

Не только опухолевые клетки, полученные из замороженных [1, 24, 27, 40], но и из фиксированных формалином хирургических образцов [25, 29, 32, 38, 39], а также циркулирующие в крови опухолевые клетки [41] и тканевые микрочипы [30].

Столь же разнообразны объекты и методы исследования. Во-первых, исследование гена *ERCC1* — оценка однонуклеотидных полиморфизмов кодона 118 и региона C8092A методами ПЦР (в реальном времени, с обратной транскрипцией, с пиросеквенированием и т.д.) [21—26, 32]. Во-вторых, транскрипционный анализ мРНК *ERCC1* методами ПЦР в реальном времени и с обратной транскрипцией [1, 24, 27, 32]. И наконец, оценка экспрессии белка *ERCC1* методом иммуногистохимии [29—32, 38, 39] и вестерн блота [1, 40] с использованием разных антител — 8F1, FL297 и EPR7277.

Отличия в информативности таких характеристик маркера очевидна, так как от экспрессии гена до синтеза белка большой путь, который может прерываться на разных его этапах. Этот фундаментальный факт подтверждён и при исследовании *ERCC1*. Показано, что оценка полиморфизмов гена и мРНК *ERCC1* не позволяют судить об уровне этого белка в клетке и об активности процесса эксцизионной репарации нуклеотидов [1, 38].

Помимо этого существуют серьёзные методические недостатки внутри каждого из перечисленных методов. К аналитическим ошибкам наиболее распространённого иммуногистохимического анализа приводит отсутствие чёткой стандартизации условий фиксации, дегидратации, гидратации, ревитализации антигена и т.д., а также контроля активности антител в зависимости от производителя и партии поставки.

Важнейший фактор неточности иммуногистохимического анализа — субъективность полуквантитативной визуальной оценки результатов и гетерогенность опухоли по уровню экспрессии опухолевых маркеров, учесть которую при исследовании локального участка опухоли невозможно. Необходимость для молекулярной диагностики интегрального показателя по всему опухолевому узлу убедительно продемонстрирована в одной из недавних работ. При иммуногистохимическом исследовании 15 участков одного и того же образца немелкоклеточного рака лёгкого дискордантность показателей экспрессии опухолевых маркеров *ERCC1*, *RRM1*, *TUBB-3* и *Ki-67* выявлена у 33—67% больных [42]. Проблема внутриопухолевой гетерогенности остро стоит и при молекулярной диагностике рака яичников [43] и рака молочной железы [44].

Этих двух серьёзных недостатков иммуногистохимического анализа позволяет избежать иммунофлуоресцентный метод, ассоциированный с проточной цитофлуориметрией [45]. Ме-

тод лишён субъективизма, позволяет одновременно строго количественно анализировать 5—10 тыс. клеток из клеточных суспензий, которые получают из хирургических образцов опухолей большого размера (до 2 см и более в диаметре). Показатель экспрессии *ERCC1* при этом становится интегральным по большому объёму опухоли, а не по локальному участку, как при иммуногистохимическом анализе, что в значительной степени нивелирует внутриопухолевую гетерогенность. Крайне важно, что количественная оценка маркера становится возможной и в клетках, полученных из асцитической жидкости при генерализации процесса. Метод использован при количественной оценке уровня, интенсивности и частоты экспрессии *ERCC1* в 37 хирургических образцах серозной аденокарциномы яичников [46], при этом показана молекулярная неоднородность сходных по гистологическому строению новообразований яичников. *ERCC1* выявлен во всех исследованных опухолях с колебанием показателя уровня экспрессии от 42 до 72%, а интенсивности — до 8 раз, при этом до 10 раз опухоли отличались по показателю интегрального индекса, рассчитанного как произведение уровня и интенсивности экспрессии маркера. В реальном времени проведения исследования, у 7 из 8 пациенток выявлена обратная корреляция индекса экспрессии *ERCC1* с клинической эффективностью химиотерапии, включающей карбоплатин и паклитаксел [46].

И наконец, причиной разноречивости заключений о значимости *ERCC1* в предсказании резистентности к препаратам платины является отсутствие унифицированного дизайна и оценки результатов исследований. Не контролируется множество параметров, влияющих на эффективность препаратов платины, такие как активность других белков репарации, белков множественной лекарственной резистентности и т. д. В ряде работ предиктивная значимость *ERCC1* оценивается по общей выживаемости, которая зависит и от эффективности последующих линий химиотерапии, часто без препаратов платины. В других исследованиях показателем эффективности платиновых препаратов служит усреднённая продолжительность безрецидивного течения болезни. Такой параметр нивелирует чёткую клинически значимую градацию опухолей на резистентные, условно резистентные и чувствительные в зависимости от времени диагностирования рецидива болезни в течение 6 мес, в период от 6 до 12 мес и после 12 мес после завершения химиотерапии соответственно. Более того, в ряде работ в группу чувствительных опухолей включают все случаи появления рецидива через 6 мес от окончания терапии, в том числе и условно резистентные.

Подводя итог, необходимо отметить, что, несмотря на неоднозначность клинических оценок, белок эксцизионной репарации повреждений ДНК — ERCC1, безусловно, является важнейшим предиктивным маркером эффективности платиновых препаратов, а главной проблемой остается чёткая унификация его изучения. Оптимально, клиническая оценка ERCC1 как предиктора резистентности препаратов платины при лечении рака яичников должна проводиться в ус-

ловиях проспективного исследования, при этом объективным показателем может служить продолжительность безрецидивного течения болезни после платиносодержащей терапии с учётом упомянутых выше общепринятых критериев разделения опухолей на резистентные, условно резистентные и чувствительные.

Поддержано грантами РФФИ (№№ 13-04-01004-а, 15-04-06991-а, 14-04-31734-мол-а), а также РАН РФ (ФИМТ-2014-205).

ЛИТЕРАТУРА

1. DeLoia J. A., Bhagwat N. R., Darcy K. M. et al. Comparison of ERCC1/XPF genetic variation, mRNA and protein levels in women with advanced stage ovarian cancer treated with intraperitoneal platinum. *Gynecologic Oncology* 2012; 126: 3: 448—454.
2. Syrios J., Banerjee S., Kaye S. B. Advanced epithelial ovarian cancer: from standard chemotherapy to promising molecular pathway targets — where are we now? *Anticancer Research* 2014; 34: 5: 2069—2077.
3. Cepeda V., Fuentes M. A., Castilla J. et al. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 2007; 7: 1: 3—18.
4. Pinto A. L., Lippard S. J. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer* 1985; 780: 3: 167—180.
5. Zwelling L. A., Michaels S., Schwartz H. et al. DNA cross-linking as an indicator of sensitivity and resistance of mouse L1210 leukemia to cis-diamminedichloroplatinum(II) and l-phenylalanine mustard. *Cancer Research* 1981; 41: 2: 640—649.
6. Plooy A. C. M., van Dijk M., Lohman P. H. M. Induction and repair of DNA cross-links in chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity, and antitumor activity. *Cancer Research* 1984; 44: 5: 2043—2051.
7. Bowden N. A. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? *Cancer Letters* 1994; 78: 2: 163—171.
8. Atsushi H., Shuji S., Kosuke A., Takafumi K. A comparison of *in vitro* platinum-DNA adduct formation between carboplatin and cisplatin. *International J Biochemistry* 1994; 26: 8: 1009—1016.
9. Almeida G. M., Duarte T. L., Farmer P. B. et al. Multiple end-point analysis reveals cisplatin damage tolerance to be a chemoresistance mechanism in a NSCLC model: implications for predictive testing. *International J Cancer* 2008; 122: 8: 1810—1819.
10. Zeng-Rong N., Paterson J., Alpert L. et al. Elevated DNA repair capacity is associated with intrinsic resistance of lung cancer to chemotherapy. *Cancer Research* 1995; 55: 21: 4760—4764.
11. Tripsianes K., Folkers G., Ab E. et al. The structure of the human ERCC1/XPF interaction domains reveals a complementary role for the two proteins in nucleotide excision repair. *Structure* 1997; 5: 12: 1849—1858.
12. Hansson J., Wood R. D. Repair synthesis by human cell extracts in DNA damaged by cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II). *Nucleic Acids Research* 1989; 17: 20: 8073—8091.
13. Westerveld A., Hoeijmakers J. H. J., van Duin M. et al. Molecular cloning of a human DNA repair gene. *Nature* 1984; 310: 5976: 425—429.
14. Jaspers N. G. J., Raams A., Silengo M. C. et al. First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *Amer J Human Genetics* 2007; 80: 3: 457—466.
15. Gregg S. Q., Robinson A. R., Niedernhofer L. J. Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. *DNA Repair* 2011; 10: 7: 781—791.
16. Lee K. B., Parker R. J., Bohr V. et al. Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3. *Carcinogenesis* 1993; 14: 10: 2177—2180.
17. Johnson S. W., Laub P. B., Beesley J. S. et al. Increased platinum-DNA damage tolerance is associated with cisplatin resistance and cross-resistance to various chemotherapeutic agents in unrelated human ovarian cancer cell lines. *Cancer Research* 1997; 57: 5: 850—856.
18. Ferry K. V., Hamilton T. C., Johnson S. W. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1305—1313.
19. Arora S., Kothandapani A., Tillson K. et al. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)* 2010; 9: 745—753.
20. De Silva I. U., McHugh P. J., Clingen P. H., Harley J. A. Defects in understand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to cisplatin. *Nucleic Acids Research* 2002; 30: 17: 3848—3856.
21. Krivak T. C., Darcy K. M., Tian C. et al. Relationship between ERCC1 polymorphisms, disease progression, and survival in the gynecologic oncology group phase III trial of intraperitoneal versus intravenous cisplatin and paclitaxel for stage III epithelial ovarian cancer. *J Clinical Oncology* 2008; 26: 21: 3598—3606.
22. Qi B.-L., Li Y., Wang N. et al. Polymorphisms of ERCC1 gene and outcomes in epithelial ovarian cancer patients with platinum-based chemotherapy. *Zhonghua fu chan ke za zhi* 2013; 48: 11: 847—852.
23. Kang S., Ju W., Kim J. W. et al. Association between excision repair cross-complementation group 1 polymorphism and clinical outcome of platinum-based chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Exp Mol Med* 2006; 38: 320—324.
24. Smith S., Su D., Rigault de la Longrais I. A. et al. ERCC1 genotype and phenotype in epithelial ovarian cancer identify patients likely to benefit from paclitaxel treatment in addition to platinum-based therapy. *J Clinical Oncology* 2007; 25: 33: 5172—5179.
25. Moxley K. M., Benbrook D. M., Queimado L. et al. The role of single nucleotide polymorphisms of the ERCC1 and MMS19 genes in predicting platinum-sensitivity, progression-free and overall survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2013; 130: 2: 377—382.
26. Marsh S., Paul J., King C. R. et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome after platinum plus taxane chemotherapy in ovarian cancer: the Scottish randomised trial in ovarian cancer. *J Clinical Oncology* 2007; 25: 29: 4528—4535.
27. Dabholkar M., Vionnet J., Bostick-Bruton F. et al. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clinical Investigation* 1994; 94: 2: 703—708.
28. Youn C.-K., Kim M.-H., Cho H.-J. et al. Oncogenic H-ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer Research* 2004; 64: 14: 4849—4857.
29. Xie C., Yin R.-t., Li Y.-l. et al. The protein expression of ERCC1 and survival in epithelial ovarian carcinoma and their clinical significance. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical Science Edition* 2011; 42: 1: 86—89.
30. Steffensen K. D., Waldström M., Jakobsen A. The relationship of platinum resistance and ERCC1 protein expression in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 2009; 19: 5: 820—825.
31. Stadlmann S., Singer G., Dirnhofer S. et al. ERCC1-immunoexpression does not predict platinum-resistance in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2008; 108: 1: 252—253.
32. Bösmüller H., Haitchi-Petnehazy S., Webersinke G. et al. Intratumoral lymphocyte density in serous ovarian carcinoma is superior to ERCC1 expression for predicting response to platinum-based therapy. *Virchows Archiv* 2011; 459: 2: 183—191.

33. *Friboulet L., Olausson K. A., Pignon J.-P. et al.* ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2013; 368: 12: 1101—1110.
34. *Bhagwat N. R., Roginskaya V. Y., Acquafondata M. B. et al.* Immunodetection of DNA repair endonuclease ERCC1-XPF in human tissue. *Cancer Research* 2009; 69: 17: 6831—6838.
35. *Vaezi A. E., Bepler G., Bhagwat N. R. et al.* Choline phosphate cytidylyl-transferase- α is a novel antigen detected by the anti-ERCC1 antibody 8F1 with biomarker value in patients with lung and head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer* 2014; 120: 12: 1898—1907.
36. *Bauman J. E., Austin M. C., Schmidt R. et al.* ERCC1 is a prognostic biomarker in locally advanced head and neck cancer: results from a randomised, phase II trial. *Br J Cancer* 2013; 109: 8: 2096—2105.
37. *Smith D. H., Fiehn A.-M. K., Fogh L. et al.* Measuring ERCC1 protein expression in cancer specimens: validation of a novel antibody. *Sci Rep* 2014; 4.
38. *Rubatt J. M., Darcy K. M., Tian C. et al.* Pre-treatment tumor expression of ERCC1 in women with advanced stage epithelial ovarian cancer is not predictive of clinical outcomes: a gynecologic oncology group study. *Gynecologic Oncology* 2012; 125: 2: 421—426.
39. *Muallem M. Z., Braicu I., Nassir M. et al.* ERCC1 Expression as a predictor of resistance to platinum-based chemotherapy in primary ovarian cancer. *Anticancer Research* 2014; 34: 1: 393—399.
40. *Milovic-Kovacevic M., Srdic-Rajic T., Radulovic S. et al.* Expression of ERCC1 protein in biopsy specimen predicts survival in advanced ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Journal of B.U.ON. : Official J Balkan Union of Oncology* 2011; 16: 4: 708—714.
41. *Kuhlmann J. D., Wimberger P., Bankfalvi A. et al.* ERCC1-positive circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients as a predictive biomarker for platinum resistance. *Clinical Chemistry* 2014; 60: 10: 1282—1289.
42. *Jakobsen J. N., Santoni-Rugiu E., Ravn J., Sørensen J. B.* Intratumour variation of biomarker expression by immunohistochemistry in resectable non-small cell lung cancer. *European J Cancer* 2013; 49: 11: 2494—2503.
43. *Colombo P.-E., Fabbro M., Theillet C. et al.* Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2014; 89: 2: 207—216.
44. *Богущ Т.А., Попова А.С., Дудко Е.А. и др.* Дискордантность статуса эстрогеновых рецепторов между первичным и метастатическим раком молочной железы — возможные причины и прогностическая значимость. *Антибиотики и химиотер* 2013; 58: 7—8: 11—18.
45. *Богущ Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др.* Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник Московского университета, Серия 2, Химия* 2011; 52: 4: 305—312.
46. *Богущ Т.А., Дудко Е.А., Семаков А.В. и др.* Иммунофлуоресцентный анализ и оценка клинической значимости экспрессии ERCC1 в ткани рака яичников. *Доклады академии наук* 2014; 457: 4: 481—486.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Богущ Татьяна Анатольевна — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией медицинской химии, заслуженный деятель науки РФ, ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина», ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина».

Попова Анна Сергеевна — лаборант-исследователь лабораторией медицинской химии, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова.

Дудко Евгений Александрович — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской химии, ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина».

Богущ Елена Александровна — к.м.н., старший научный сотрудник хирургического отделения № 2 (диагностики опухолей), ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина».

Тюляндина Александра Сергеевна — к.м.н., старший научный сотрудник отделения клинической фармакологии и химиотерапии, ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина».

Тюлядин Сергей Алексеевич — д.м.н., профессор, руководитель отделения клинической фармакологии и химиотерапии, ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина».

Давыдов Михаил Иванович — д.м.н., академик РАН и РАМН, директор, ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина».

КОМПЛЕМЕНТАРНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ MALDI-TOF MS И АНАЛИЗА ДАННЫХ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ — КРИВАЯ ПЛАВЛЕНИЯ ДЛЯ БЫСТРОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВЫХ СТАФИЛОКОККОВ И ВАНКОМИЦИНОУСТОЙЧИВЫХ ЭНТЕРОКОККОВ.

COMPLEMENTARY USE OF MALDI-TOF MS AND REAL-TIME PCR-MELT CURVE ANALYSIS FOR RAPID IDENTIFICATION OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI AND VRE / W.-S. CHAN, T.-M. CHAN, T.-W. LAI, J. F.-W. CHAN, R. W.-M. LAI, C. K.-C. LAI, B. S.-F. TANG* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 2: 441–447.

Задачей исследования было разработать быстрый метод для рутинного скрининга метициллиноустойчивых стафилококков (MRSA) и ванкомициноустойчивых энтерококков (VRE) среди клинических штаммов и положительных гемокультур. Метод состоит из 2 частей: ионизационной время-пролётной масс-спектропии с использованием матрицы (MALDI-TOF MS), идентифицирующей стафилококки и энтерококки, и последующего определения резистентности с помощью анализа ПЦР в реальном времени-кривая плавления (real-time-PCR-melt curve) без экстракции ДНК. Последняя часть включала тройной тест (гены *mecA*, *mecA*_{LGA251} и Пантон-Валентайн лейкоцидина) для всех штаммов стафилококков, двойной ПЦР-тест (гены *mecA*/*mecA*_{LGA251} и *nuc*) для гемокультур, двойной тест (гены *vanA* и *vanB*) для энтерококков. Всего было протестировано 124 клинических штамма и 56 положительных гемокультур. MALDI-TOF MS была выполнена с помощью Microflex LT (Bruker Daltonik, Бремен, Германия), а анализ ПЦР в реальном времени-кривая плавления с использованием Rotor-Gene Q (Qiagen, Хилден, Германия). Время определения составило менее 2,5 ч. Полученные результаты показали 100% совпадение с данными тестирования чувствительности и других референс-методов для всех штаммов и гемокультур энтерококков. Для гемокультур стафилококков этот показатель был равен 97,5%. Предложенный метод быстро, экономично и надёжно выявлял *mecA*_{LGA251}, *vanB1* и *vanB2* генотипы, не определяемые большинством других коммерческих методов. Для подтверждения этого заключения, особенно в отношении не часто встречающихся генотипов, требуются крупномасштабные скрининговые исследования.

*Department of Pathology, Hong Kong Sanatorium & Hospital, Hong Kong, China.

ЭВОЛЮЦИЯ УСТОЙЧИВОГО К КАРБАПЕНЕМАМ ACINETOBACTER BAUMANNII, УСТАНОВЛЕННАЯ

С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЦЕЛОГО ГЕНОМА И СРАВНИТЕЛЬНОГО ГЕНОМНОГО АНАЛИЗА. ОБЗОР.

EVOLUTION OF CARBAPENEM-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII REVEALED THROUGH WHOLE-GENOME SEQUENCING AND COMPARATIVE GENOMIC ANALYSIS / H. LI, F. LIU, Y. ZHANG, X. WANG, C. ZHAO, H. CHEN, F. ZHANG, B. ZHU, Y. HU, H. WANG* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY FEBRUARY 2015; 59: 2: 1168–1176.

Acinetobacter baumannii — очень важный нозокомиальный патоген, характеризующийся развитым механизмом мультилекарственной устойчивости. Для выполнения секвенирования целого генома и сравнительного геномного анализа было отобрано 35 репрезентативных клинических штаммов *A. baumannii*, выделенных в 13 больницах 9 городов Китая в период 1999–2011 гг., включая 32 штамма, устойчивых к карбапенемам (КП), и 3 штамма, чувствительных к КП. Филогенетический анализ показал, что самый ранний штамм 1999BJAB11 и 2 штамма, выделенные в 2004 г. в провинции Чжэнцзян, являются родоначальниками КП-устойчивых штаммов *A. baumannii*. Было идентифицировано 10 типов островков устойчивости (ОУ) AbaR. В 2 штаммах, выделенных в Чжэнцзяне в 2004 г., был также идентифицирован ранее неизвестный ОУ AbaR, содержащий 2-компонентный регулятор отклика; белки, связанные с устойчивостью, и белки RND-эффлюкс системы. В каждом штамме присутствовали множественные транспозоны и инсерционные последовательности (ИП), становившиеся разнообразнее по мере эволюции. О некоторых ИП и транспозонах было сообщено впервые, большинство из них было обнаружено в штаммах из 2 провинций. Анализ отличительных черт генома выявил разнообразие генов устойчивости, наружных полисахаридов, рестрикционно-модификационной системы даже в филогенетически и эпидемиологически близко родственных штаммах. В геномном регионе выделительной системы IV типа *csuE* и центральном липополисахаридном локусе были найдены связанные с ИП делеции. В регионе утилизации гема наблюдались рекомбинации. Также были идентифицированы гены природной устойчивости (варианты *bla*_{ADC} и *bla*_{OXA-51-like}) и 3 новых варианта *bla*_{OXA-51-like} (*bla*_{OXA-424}, *bla*_{OXA-425}, и *bla*_{OXA-426}). Полученные результаты могут улучшить понимание эволюционного процесса, способствующего возникновению КП-устойчивых штаммов *A. baumannii*, и прояснить молекулярный эволюционный механизм у *A. baumannii*.

*Department of Clinical Laboratory, Peking University People's Hospital, Beijing, China.

**АНТИМИКРОБНАЯ ГЕТЕРОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ:
ПОНЯТИЕ, НУЖДАЮЩЕЕСЯ В ЧЁТКОСТИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ. ОБЗОР.**

**ANTIMICROBIAL HETERORESISTANCE: AN EMERGING
FIELD IN NEED OF CLARITY / O. M. EL-HALFAWY,
M. A. VALVANO* // CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEW
JANUARY 2015; 28: 1: 191–207.**

Термин «гетерорезистентность» описывает явление существования субпопуляций казалось бы изогенной бактерии с разными уровнями чувствительности к определённому антибиотику в пределах одной популяции. К сожалению, недостаток стандартных методов определения гетерорезистентности привёл к неадекватному использованию данного термина. Гетерорезистентность известна, по крайней мере, с 1947 г. и наблюдается у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Её клиническая значимость может быть существенной, поскольку в процессе антибиотикотерапии возможен отбор более устойчивых субпопуляций. Использование нестандартных методов определения гетерорезистентности, являющихся дорогостоящими из-за значительных затрат труда и ресурсов, затрудняет оценку размеров и тяжести этого явления в клинике. Обзор охватывает имеющуюся литературу и предлагает рекомендации для чёткого определения критериев гетерорезистентности бактерий. Это поможет оценить глобальную роль гетерорезистентности в клинике и разработать единое руководство в целях повышения показателя терапевтических исходов.

* Centre for Human Immunology and Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНОВ NDM
МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ СРЕДИ
КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ENTEROBACTERIACEAE,
СОБРАННЫХ В ХОДЕ МЕЖДУНАРОДНОГО
ОБЗОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ SMART 2008–2012 ГГ.**

**DISSEMINATION OF NDM METALLO- β -LACTAMASE
GENES AMONG CLINICAL ISOLATES
OF ENTEROBACTERIACEAE COLLECTED DURING
THE SMART GLOBAL SURVEILLANCE STUDY
FROM 2008 TO 2012 // D. BIEDENBACH*,
S. BOUCHILLON, M. HACKEL, D. HOBAN,
K. KAZMIERCZAK, S. HAWSER, R. BADAL //
ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY
FEBRUARY 2015; 59: 2: 826–830.**

Распространённость карбапенемазных ферментов продолжает увеличиваться. К Ambler классу В фер-

ментов относится нью-дельийская металло-бета-лактамаза (NDM). Этот уникальный фермент способен гидролизовать почти все бета-лактамные антибиотики. Его быстрое распространение создаёт глобальную проблему. Выбор терапевтических средств для пациентов, инфицированных такими штаммами, затруднён, так как общим явлением становится перекрёстная устойчивость к антибиотикам других классов. Исследование отслеживает тенденции антимикробной устойчивости (SMART), носит глобальный обзорный характер и оценивает антимикробную чувствительность многочисленных видов грамотрицательных бактерий, выделенных от больных с интраабдоминальными и мочевыми инфекциями. Методами Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и молекулярным анализом было идентифицировано 134 штамма Enterobacteriaceae (9 видов) и 1 штамм Acinetobacter sp., несущие *bla*_{NDM} гены. Эти штаммы были выделены в 9 странах, и 95% штаммов относятся к NDM-1 варианту. Значения МПК₉₀ эртапенема и имипенема соответственно равны >4 мг/л и >8 мг/л. Ни один бета-лактамный антибиотик и ни одна комбинация бета-лактама+ингибитор бета-лактамазы не были активны в отношении этих штаммов. Общей была их устойчивость к амикацину (79,9%) и левофлоксацину (82,8%). Почти все штаммы несли дополнительные ферменты, включая AmpC цефалоспорины и бета-лактамазы расширенного спектра. Все это диктует срочную необходимость контроля за инфекцией и продолжение глобального мониторинга штаммов, несущих NDM ферменты, что подтверждается недавними вспышками инфекций.

* International Health Management Associates, Inc., Schaumburg, Illinois, USA.

**ГЕНОМНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ KLEBSIELLA
PNEUMONIAE В ИТАЛИИ И НОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ
О ПРОИСХОЖДЕНИИ И ГЛОБАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ
ЕЁ УСТОЙЧИВОСТИ К КАРБАПЕНЕМНЫМ
АНТИБИОТИКАМ.**

**GENOMIC EPIDEMIOLOGY OF KLEBSIELLA
PNEUMONIAE IN ITALY AND NOVEL INSIGHTS
INTO THE ORIGIN AND GLOBAL EVOLUTION
OF ITS RESISTANCE TO CARBAPENEM ANTIBIOTICS /
S. GAIARSA, F. COMANDATORE, P. GAIBANI,
M. CORBELLA, C. DALLA VALLE, S. EPIS, E. SCALTRITI,
E. CARRETTO, C. FARINA, M. LABONIA, M. P. LANDINI,
S. PONGOLINI, V. SAMBRI, C. BANDI, P. MARONE,
D. SASSERA* // ANTIMICROBIAL AGENTS
CHEMOTHERAPY JANUARY 2015; 59: 1: 389–396.**

Klebsiella pneumoniae находится в первом ряду грамотрицательных патогенных бактерий с антимикробной устойчивостью из-за широко известной

устойчивости штаммов *K.pneumoniae* к цефалоспорином 3-го поколения и карбапенемам. Глобальное распространение таких штаммов вызывает большую озабоченность, т. к. нозокомиальные инфекции, вызванные *K.pneumoniae*, ассоциируются с высоким уровнем заболеваемости и смертности. Было выполнено секвенирование геномов 89 штаммов *K.pneumoniae*, выделенных в 6 больницах Италии. Для получения эпидемиологической картины *K.pneumoniae* в Италии были отобраны штаммы по антибиотикотипу, независимо от мультилокусного сиквенс-типа. Тридцать один (31) устойчивый к карбапенемам штамм, продуцировал карбапенемазу, 29 штаммов были устойчивы к цефалоспорином 3-го поколения, 29 штаммов были чувствительны к вышеуказанным антибиотикам. Было проведено сравнение геномов со всеми известными по базе данных последовательностями 319 геномов, охватывающих известное глобальное разнообразие *K.pneumoniae*. Биоинформационный анализ полного набора данных позволил смоделировать филогению всего вида, определить распределение типов антибиотикоустойчивости и датировать дифференциацию между представляющими интерес группами, эволюционировавшими от общего предка. У всех штаммов клонального комплекса 258, самой широко распространённой карбапенемоустойчивой группы *K.pneumoniae*, была выявлена характерная 1,3-Mb рекомбинация. На основе вновь установленных и ранее известных сведений о рекомбинации была смоделирована эволюция этого комплекса. Настоящее исследование расширило понимание эволюции *K.pneumoniae* с учётом нового углублённого знания характерных черт генома и обрисовало обоснованный эпидемиологический сценарий для *K.pneumoniae* в Италии.

* Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy.

ГЕНОМНЫЙ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ КОЛИСТИНОУСТОЙЧИВЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ВЫЯВИЛ МНОЖЕСТВЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ.

GENOMIC AND TRANSCRIPTOMIC ANALYSES OF COLISTIN-RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* REVEAL MULTIPLE PATHWAYS OF RESISTANCE / M. S. WRIGHT, Y. SUZUKI, M. B. JONES, S. H. MARSHALL, S. D. RUDIN, D. VAN DUIN, K. KAYE, M. R. JACOBS, R. A. BONOMO*, M. D. ADAMS // *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* JANUARY 2015; 59: 1: 536–543.

Появление штаммов *Klebsiella pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью привело к более частому терапевтическому исполь-

зованию колистина. Но из клиник всё чаще поступают сообщения о росте устойчивости к колистину (ColI^r). Генетический механизм ColI^r у *K.pneumoniae* не полностью изучен. С помощью комбинации методов секвенирования генома и анализа транскрипционного профиля на основе РНК-секвенирования (RNA-Seq) у девяти ColI^r клинических штаммов были установлены различные генетические механизмы устойчивости. ColI^r была связана с мутациями в 3 различных генах и разной степенью генной экспрессии. У всех ColI^r штаммов наблюдалась активация *pmrH* оперона, кодирующего модификацию 4-амино-4-дезоксид-1-арабинозы (Ara4N) липида А. У 6 штаммов было отмечено изменение гена *mgrB*. Один штамм имел мутацию в гене *phoQ*. У семи вышеуказанных штаммов возросла экспрессия *phoQ*, но не изменилась экспрессия гена *pmrCAB*, задействованного в присоединении фосфоэтаноламина к липополисахариду (ЛПС). У 2 штаммов были обнаружены индивидуальные мутации в ранее не охарактеризованном гене гистидин киназы, являющегося частью двухкомпонентной регуляторной системы, обозначенной как *crrAB*. У этих штаммов возросла экспрессия *pmrCAB*, *crrAB* и смежного с ними гликозилтрансферазного гена, но не *phoPQ*. При добавлении аллелей дикого типа чувствительность к колистину у обоих штаммов восстанавливалась. Гены *crrAB* присутствовали в большинстве геномов *K.pneumoniae*, но отсутствовали у *Escherichia coli*. К дополнительным активированным генам у всех штаммов относились гены, участвующие в транспорте катионов и поддержании целостности мембраны. Поскольку гены *crrAB* присутствуют только в некоторых штаммах механизм ColI^r может зависеть от генетического фона.

* Research Service, Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center, Cleveland, Ohio, USA.

НАБЛЮДЕНИЕ ЗА БОЛЬНЫМИ, ЛЕЧЕННЫМИ КОЛИСТИНОМ, ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЧАСТОТЫ И ИСХОДОВ ИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ УСТОЙЧИВЫМИ К КАРБАПЕНЕМАМ МИКРООРГАНИЗМАМИ.

TRACKING COLISTIN-TREATED PATIENTS TO MONITOR THE INCIDENCE AND OUTCOME OF CARBAPENEM-RESISTANT GRAM-NEGATIVE INFECTIONS / S. S. KADRI*, S. F. HOHMANN, E. J. ORAV, S. L. BONNE, M. A. MOFFA, J. G. TIMPON J. R. STRICH, T. PALMORE, K. B. CHRISTOPHER, C. VARUGHESE, D. C. HOOPER, R. L. DANNER // *CLINICAL INFECTIOUS DISEASES* 2015; 60: 1: 79–87.

Существующие механизмы обследования могут недооценивать частоту инфекций, вызванных грамотрицательными устойчивыми к карбапенемам микроорганизмами (ГОКУИ). Устойчивость к карбапенемам повышает риск летального исхода, но тенденции «на длительный период» неизвестны. Было выполнено ретроспективное когортное исследование в 40 академических медицинских центрах с использованием базы данных выписанных пациентов, чтобы установить поступивших взрослых больных без диагноза муковисцидоза в период 2006—2012 гг. и получавших в/в колистин в течение более 3 последовательных дней или умерших в ходе терапии («колистин случаи», КС). Первичным показателем было число КС/100000 поступлений/год и изменение уровня повышенной больницы смертности по сравнению с числом выписанных из больницы. Вторым показателем включал общую медиану и продолжительность пребывания в ОИТ. С 2006 г. по 2012 г. было идентифицировано 5011 пациентов с КС, за 7 лет наблюдений число КС/100000 поступлений/год возросло с 35,56 до 92,98 ($p < 0,001$). Показатель отношения внутрибольничной смертности среди КС к числу выписавшихся домой снизилось в среднем на 5,2% ($p = 0,04$), количество пациентов, выписанных в специализированные лечебные учреждения ($p = 0,24$) и хосписы ($p = 0,89$) осталось постоянным. Медиана и продолжительность нахождения в ОИТ снизились до 7,5 и 6 дней соответственно ($p < 0,001$). По сводным данным 4 больниц 81,6% КС относились к ГОКУИ, в т.ч. инфекциям кровотока. Но 53% инфекций кровотока, обусловленных ГОКУ микроорганизмами с экстенсивной лекарственной устойчивостью, в двух из 4 больниц не отвечали критериям КС. КС представляют популяцию тяжелобольных с высокой вероятностью наличия ГОКУИ. «Колистинный след» (отслеживание колистина) является новой стратегией мониторинга случаев и летальных исходов ГОКУИ, особенно вызванных бактериями с экстенсивной лекарственной устойчивостью. При том, что число КС за 7 лет наблюдения утроилось, большинство больных после госпитализации выписалось домой.

* Critical Care Medicine Department, Clinical Center, National Institutes of Health, 10 Center Dr, Room 2C145, Bethesda, MD 20892-1662.

РАЗЛИЧНЫЙ ВКЛАД ACRAV И OQXAB СИСТЕМ ПОМПОВОГО ВЫБРОСА В МУЛЬТИЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*.

DIFFERENTIAL CONTRIBUTION OF ACRAV AND OQXAB EFFLUX PUMPS TO MULTIDRUG

RESISTANCE AND VIRULENCE IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* / S. BIALEK-DAVENET, J.-P. LAVIGNE, K. GUYOT, N. MAYER, R. TOURNEBIZE, S. BRISSE, V. LEFLON-GUIBOUT, M.-H. NICOLAS-CHANOINE* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 1: 81—88.

Сверхэкспрессия AcrAB и недавно описанной OqxAB систем помпового выброса у *Klebsiella pneumoniae* ассоциируется с фенотипом, характеризующимся перекрёстной устойчивостью к антибиотикам, но механизмы регуляции в значительной мере неизвестны. Более того, для AcrAB было показано, что он участвует в проявлении вирулентности *K. pneumoniae*, но роль OqxAB ещё не определена. Методами секвенирования целого генома, ПЦР в реальном времени, комплементации и на *Caenorhabditis elegans* модели вирулентности были исследованы клинический штамм *K. pneumoniae* KPBj1 E⁺, перекрёстно устойчивый к хинолонам, хлорамфениколу и цефокситину, и его фенотипический ревертант KPBj1 Rev, чувствительный к антибиотикам. Была обнаружена точечная мутация в репрессорном гене *oqxR* KPBj1 E⁺, которая усиливала экспрессию генов *rarA*, кодирующих транскрипционный регулятор, а также *oqxB*, но не *acrB*. Комплементация с *oqxR* дикого типа восстанавливала чувствительность к антибиотикам и нормализовала уровни экспрессии *rarA* и *oqxB*. Секвенирование целого генома показало, что KPBj1 Rev утратил целый *rarA-oqxABR* locus, расположенный непосредственно с интеграционной горячей точкой фага P4. Эта большая делеция, вероятно, ответственна за значительно более низкий уровень вирулентности штамма KPBj1 Rev в сравнении с KPBj1 E⁺. Более того, было установлено, что штамм KPBj1 E⁺ Δ *acrB* был существенно менее вирулентен, чем его родительский штамм. Настоящее исследование продемонстрировало значение сверхэкспрессии помпового выброса OqxAB, обусловленной мутацией в гене *oqxR*, для антибиотикоустойчивого фенотипа клинического штамма, и предполагает, что для высокого уровня вирулентности необходимо наличие AcrAB в сочетании с сверхэкспрессией OqxAB.

* Service de Microbiologie, Hôpital Beaujon, 100 boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy, France.

КОНТРОЛЬ ЗА КАРБАПЕНЕМОУСТОЙЧИВЫМ *ACINETOBACTER BAUMANNII* ПРЕДОТВРАЩАЕТ РАЗВИТИЕ КЛИНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ: РЕТРОСПЕКТИВНОЕ КОГОРТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.

SURVEILLANCE CULTURES GROWING CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER*

BAUMANNII PREDICT THE DEVELOPMENT OF CLINICAL INFECTIONS: A RETROSPECTIVE COHORT STUDY / R. LATIBEAUDIERE, R. ROSA, P. LAOWANSIRI, K. ARHEART, N. NAMIAS, L. S. MUNOZ-PRICE* // CLINICAL INFECTIOUS DISEASES 2015; 60: 3: 415—422.

Целью исследования было определение влияния присутствия карбапенемоустойчивого (КУ) *Acinetobacter baumannii* наряду с основными культурами на дальнейшее развитие клинической инфекции. Было выполнено ретроспективное когортное исследование в специализированной больнице в период с января 2010 г. по ноябрь 2011 г. В исследование были включены все последовательно поступавшие в травматологическое отделение интенсивной терапии пациенты при отсутствии у них *A. baumannii* инфекции до отбора первой контрольной пробы. Затем у них проводили еженедельный контроль за отслеживаемыми культурами (в пробах из прямой кишки, респираторных выделений). Был выполнен одно- и многофакторный анализ с использованием log-биномной регрессии. Анализ выживаемости был проведён по методу пропорциональных рисков (по Cox). Всего было включено 364 пациента, из которых у 49 (13,5%) наряду с контрольной (основной) культурой присутствовал КУ *A. baumannii*. Риск развития последующей *A. baumannii* инфекции у больных с положительной пробой был в 8,4 (95% ДИ 5,6—12,7; $p < 0,0001$) раза выше, чем у больных с отрицательной пробой. Многофакторный анализ показал существенную связь между клинической инфекцией при наличии обеих контролируемых культур (относительные риски [RR], 5,9 [95% ДИ, 3,8—9,3]; $p < 0,0001$) и искусственной вентиляцией лёгких (RR, 4,3 [95% ДИ, 1,03—18,2]; $p = 0,05$). Согласно анализу на выживаемость вариabильным фактором развития клинической инфекции было только наличие контролируемых культур (отношение рисков, 16,3 [95% ДИ, 9,1—29,1]; $p < 0,001$). Присутствие КУ *A. baumannii* в пробах тесно связано с последующим развитием КУ *A. baumannii* инфекции. Профилактические меры следует сосредоточить на ограничении инфицирования данным организмом в период госпитализации.

* Health Research Center, Ste 2100, 8701 Watertown Plank Road, PO Box 26509, Milwaukee, WI 53226-0509, USA.

ТИГЕЦИКЛИН ПОДАВЛЯЕТ ОБРАЗОВАНИЕ ТОКСИНОВ А И В И СПОРУЛЯЦИЮ У *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*.

TIGECYCLINE SUPPRESSES TOXIN A AND B PRODUCTION AND SPORULATION IN *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* / M. J. ALDAPE*, D. D. HEENEY, A. E. BRYANT,

D. L. STEVENS // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 1: 153—159.

Инфекция *Clostridium difficile* (CDI) опосредована сильными внеклеточными токсинами и распространяется главным образом посредством бактериальных спор. Было показано, что некоторые антибиотики стимулируют образование токсина в зависимости от штамма, действие же более новых антибиотиков остаётся неизученным. Сравнивали *in vitro* действие ингибитора синтеза белка тигециклина на споруляцию и образование токсина у дикого (9689) и гипервирулентного BI/NAP1/027 (5325) штаммов *C. difficile*. При 1/4×МПК тигециклин стимулировал повышенную и более раннюю экспрессию гена токсина А и/или В у обоих штаммов, хотя пропорциональное увеличение белка токсина наблюдалось только у штамма 9689. На самом деле, у гипервирулентного штамма 5325 образование токсина было неожиданно подавлено. Для сравнения, субингибиторные концентрации ванкомицина и метронидазола также стимулировали образование белка токсина у дикого штамма, но не у гипервирулентного. Кроме того, тигециклин в дозозависимом режиме снижал продукцию жизнеспособных спор у обоих штаммов *C. difficile*. Таким образом, можно полагать, что при лечении тигециклином больных с CDI возможно как успешно контролировать течение болезни, так и ограничивать распространение инфекции за счёт нарушения споруляции.

* Department of Veterans Affairs Medical Center, 500 W. Fort Street, Boise, ID 83702, USA.

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛИТЕЛЬНО ПРИМЕНЯЕМЫЕ ЧЕЛОВЕКОМ: АНТИСТАФИЛОКОККОВАЯ АКТИВНОСТЬ И ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ МЕСТНЫХ ПРОТИВОПЛЁНОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ.

REDOX-ACTIVE COMPOUNDS WITH A HISTORY OF HUMAN USE: ANTISTAPHYLOCOCCAL ACTION AND POTENTIAL FOR REPURPOSING AS TOPICAL ANTIBIOFILM AGENTS / N. OOI, E. A. EADY, J. H. COVE, A. J. O'NEILL* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 2: 479—488.

Исследовали антистафилококковую и антиплёночную активность и механизм действия ряда окислительно-восстановительных (ОВ) соединений с тем, чтобы подтвердить предварительные доклинические заключения о возможности местного лечения ими стафилококковых инфекций, в т.ч. сопровождающихся образованием биоплёнок.

Антистафилококковую активность оценивали микроразведениями в бульоне и по динамике гибели (time-kill study) как растущих, так и слабо растущих и покоящихся клеток. Активность ОВ соединений в отношении биоплёнок оценивали на приборе Calgary Biofilm Device. Полученные результаты использовали для проверки способности ОВ соединений нарушать мембраны, проникать в биоплёнки и физически разрушать их, а также для оценки возможной устойчивости к ним. Влияние ОВ соединений на клетки кожи человека проверяли на модели, эквивалентной живым клеткам. Все 15 протестированных ОВ соединений продемонстрировали антистафилококковую активность в отношении планктонных культур (МПК 0,25–128 мг/л), а 7 из них ликвидировали биоплёнки (МК эрадикации биоплёнки 4–256 мг/л). Механизм действия всех соединений заключался в нарушении бактериальной мембраны, отдельные соединения вызывали разрушение матрицы биоплёнки. При действии на биоплёнки двух наиболее перспективных соединений — целастрола и нордигидрогуаретовой кислоты (НДГК) совместно с гентамицином был обнаружен синергидный эффект как с позиции антибактериальной активности, так и специфической токсичности в отношении биоплёнки, без повреждения при этом кожи на искусственной модели при местном применении, а также низкий потенциал развития устойчивости. В отличие от апробированных антибактериальных соединений некоторые ОВ соединения были способны ликвидировать биоплёнки стафилококков. Из них целастрол и НДГК представляются наиболее перспективными в качестве препаратов местного применения при обработке стафилококковых биоплёнок.

* Antimicrobial Research Centre and School of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds, Leeds, UK.

КОМБИНАЦИЯ ГИПОТИОЦИАНИТА И ЛАКТОФЕРРИНА, ALX-109, УСИЛИВАЕТ СПОСОБНОСТЬ ТОБРАМИЦИНА И АЗТРЕОНАМА ЭЛИМИНИРОВАТЬ БИОПЛЁНКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, РАСТУЩИЕ НА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ.

COMBINATION OF HYPOTHIOCYANITE AND LACTOFERRIN (ALX-109) ENHANCES THE ABILITY OF TOBRAMYCIN AND AZTREONAM TO ELIMINATE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILMS GROWING ON CYSTIC FIBROSIS AIRWAY EPITHELIAL CELLS / S. MOREAU-MARQUIS*, B. COUTERMARSH, B. A. STANTON// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 1: 160–166.

Хелатное железо может стать новым терапевтическим средством для элиминации биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* в лёгких больных муковисцидозом. Исследовали способность комбинации (ALX-109), содержащей железо-связывающий гликопротеин лактоферрин и бактерицидный гипотиоцианит, одной и в сочетании с тобрамицином или азтреонамом, снижать рост биоплёнок *P.aeruginosa* на эпителиальных клетках дыхательных путей больных муковисцидозом. Биоплёнки *P.aeruginosa* PAO1 и 6 клинических штаммов *Pseudomonas*, выросшие на апикальной поверхности соединяющихся монослоёв эпителиальных клеток муковисцидозных дыхательных путей, обрабатывали ALX-109 или комбинацией ALX-109 с тобрамицином или азтреонамом. Оставшиеся после обработки жизнеспособные КОЕ определяли подсчётом на чашках. ALX-109 снижала образование биоплёнки *P.aeruginosa* PAO1, но не влияла на сформировавшиеся биоплёнки. ALX-109 усиливала способность тобрамицина и азтреонама подавлять образование биоплёнки PAO1 и редуцировать зрелые биоплёнки. Комбинация ALX-109 с тобрамицином оказывала аддитивный эффект на разрушение зрелых биоплёнок, образованных 6 клиническими штаммами *P.aeruginosa*, выделенными из мокроты больных муковисцидозом. Мукоидные штаммы *P.aeruginosa* были наиболее чувствительны к комбинации тобрамицина и ALX-109. ALX-109 также усиливала разрушающее действие азтреонама на зрелые биоплёнки *P.aeruginosa* PAO1. Ингаляционная терапия комбинацией гипотиоцианит+лактоферрин с TOBI® (тобрамицин) или Cayston® (азтреонам) может быть полезна для снижения бактериальной нагрузки *P.aeruginosa* в дыхательных путях больных муковисцидозом.

* Department of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, NH 03755, USA.

НОВАЯ СТРАТЕГИЯ ПОДАВЛЕНИЯ БИОПЛЁНКИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ, МИШЕНЬЮ КОТОРЫХ ЯВЛЯЕТСЯ МОЛЕКУЛА ШАПЕРОНА DNAK.

NOVEL STRATEGY FOR BIOFILM INHIBITION BY USING SMALL MOLECULES TARGETING MOLECULAR CHAPERONE DNAK / K. ARITA-MORIOKA, K. YAMANAKA, Y. MIZUNOE, T. OGURA, S. SUGIMOTO* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JANUARY 2015; 59: 1: 633–641.

Биоплёнки представляют сложное сообщество микроорганизмов, прикрепленных к поверхностям и погруженных в продуцируемую ими же вне-

клеточную матрицу. Поскольку клетки биоплёнки приобретают повышенную толерантность к антимикробным соединениям и иммунной системе хозяина, инфекционные заболевания, сопровождающиеся образованием биоплёнок, имеют тенденцию становиться хроническими. В данной работе показано, что (молекулярный) шаперон DnaK (из класса белков-телохранителей, участвующих в репликации ДНК, отклике на гиперосмотический и тепловой шок и др.) очень важен для образования биоплёнки, и химическое подавление клеточных функций DnaK эффективно предотвращает развитие биоплёнки. Генетический, микробиологический и микроскопический анализ показал, что делеция *dnaK* гена заметно снижает синтез внеклеточных амилоидных карлинов, белкового компонента, обеспечивающего прочность биоплёнки у *Escherichia coli*. Была проверена способность ингибиторов DnaK: мирицетина (МИР), телмисартана, панкурония бромида и зафирлукаста — предотвращать образование биоплёнки *E. coli*. Только МИР, широко распространённый флавонол растительного происхождения, подавлял образование биоплёнки в дозозависимом режиме (50% ингибиторная концентрация, $IC_{50} = 46,2 \mu M$), не оказывая влияния на рост. Трансмиссионной электронной микроскопией было показано, что МИР подавляет образование карлина. Фенотипический анализ термочувствительности, деления клеток, внутриклеточного уровня РНК полимеразы сигма фактора $RpoH$ и чувствительности к ванкомицину показал, что МИР изменял фенотип клеток *E. coli* дикого типа, делая их подобными клеткам изогенного мутанта с *dnaK* делецией, т.е. подавлял клеточную функцию DnaK. Таким образом, проведённое исследование дало глубокое понимание роли DnaK при образовании биоплёнок и показало, что DnaK, в свою очередь, является идеальной мишенью противоплёночных лекарственных средств.

* Department of Bacteriology, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan.

ПОДАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЁНКИ *SALMONELLA ENTERICA* НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ МИМЕТИКАМИ АДЕНОЗИНА.

INHIBITION OF *SALMONELLA ENTERICA* BIOFILM FORMATION USING SMALL-MOLECULE ADENOSINE MIMETICS / J. A. KOORMANA, J. M. MARSHALL, A. BHATIA, T. EGUALE, J. J. KWIEK, J. S. GUNN* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JANUARY 2015; 59: 1: 76—84.

Биоплёнки, часто ассоциирующиеся с хроническими инфекциями, и персистенция *Salmonella enterica*

в окружающей среде способствуют повышенной колонизации поверхностей и возможности инфицирования новых хозяев. Образование *Salmonella enterica* серовар Typhі биоплёнок на жёлчных камнях человека и мышей усиливало колонизацию жёлчного пузыря и распространение бактерий, а наличие биоплёнок *Salmonella enterica* серовар Typhimurium способствовало долговременной персистенции патогена в среде учреждений медицины, пищевой и сельскохозяйственной промышленности. Регуляция экспрессии многих вирулентных и плёнкообразующих процессов у сальмонеллы происходит с участием киназных ферментов. Киназы играют важную роль в фосфорилировании и транспорте энергии в клетке и обладают АТФ-связывающим «карманом», необходимым для их функционирования. Многие другие клеточные белки также нуждаются в АТФ для проявления активности. В исследовании была проверена гипотеза о том, что фармакологическое воздействие на АТФ-зависимые ферменты с помощью соединений, имитирующих аденозин (миметики аденозина) может снижать или подавлять образование биоплёнки. В результате скрининга 3000 соединений из библиотеки АТФ-миметиков было выделено одно соединение (7955004), способное значительно снижать образование биоплёнки у *S. typhimurium* и *S. typhi*. Соединение не обладало бактерицидными или бактериостатическими свойствами в отношении *S. typhimurium* и цитотоксическими свойствами в отношении клеток млекопитающих. С использованием метода определения аффинитета на АТФ-сефарозной матрице были выявлены потенциальные белки-мишени соединения 7955004, идентифицированные как белок семейства шаперонов GroEL и пурин нуклеозид фосфорилаза типа DeoD. При проверке действия 7955004 на другие плёнкообразующие бактерии было выявлено сильное подавляющее действие на биоплёнки *Acinetobacter baumannii*. Итак, идентификация соединения, способного подавлять биоплёнки *Salmonella*, дало новое направление для терапевтического воздействия на плёнкообразующие штаммы *Salmonella*, а также на биоплёнки других патогенов.

* Microbial Infection and Immunity, Center for Microbial Interface Biology, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA.

IN VITRO АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ AZD0914, НОВОГО СПИРОПИРИМИДИНТРИОНОВОГО ИНГИБИТОРА ДНК ГИРАЗЫ/ТОПОИЗОМЕРАЗЫ В ОТНОШЕНИИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ, ОТДЕЛЬНЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И АТИПИЧНЫХ БАКТЕРИЙ.

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AZD0914, A NEW SPIROPYRIMIDINTRIONE DNA

GYRASE/TOPOISOMERASE INHIBITOR WITH POTENT ACTIVITY AGAINST GRAM-POSITIVE, FASTIDIOUS GRAM-NEGATIVE, AND ATYPICAL BACTERIA / M. D. HUBAND*, P. A. BRADFORD, L. G. OTTERSON, G. S. BASARAB, A. C. KUTSCHKE, R. A. GIACOBBE, S. A. PATEY, R. A. ALM, M. R. JOHNSTONE, M. E. POTTER, P. F. MILLER, J. P. MUELLER // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JANUARY 2015; 59: 1: 467—474.

AZD0914 — новый спироимидинтрионовый ингибитор бактериальной ДНК гиразы/топоизомеразы, с высокой антибактериальной *in vitro* активностью в отношении основных грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, и *Streptococcus agalactiae*), некоторых грамотрицательных (*Haemophilus influenzae* и *Neisseria gonorrhoeae*), атипичных (*Legionella pneumophila*) и анаэробных (*Clostridium difficile*) видов бактерий, включая устойчивые к фторхинолонам. AZD0914 подавляет биосинтез ДНК с накоплением двухцепочечных отрезков, что отличает его от механизма ингибирования других антибактериальных соединений. AZD0914 стабилизирует и удерживает ковалентный комплекс гиразы и двухцепочечных отрезков ДНК в определённых условиях, таким образом блокируя восстановление двухцепочечной разорванной ДНК и образование кольцевой ДНК. Хотя этот механизм действия похож на наблюдаемый у фторхинолонов, он отличается от него. AZD0914 характеризовался низкой частотой спонтанной устойчивости у *S. aureus*, а возникающие мутации находились в *gyrB*. У свежевыделенных клинических штаммов, резистентных к фторхинолонам или антибиотикам других классов, включая макролиды, бета-лактамы, гликопептиды или оксазолидиноны, не наблюдалось перекрёстной устойчивости к AZD0914. Данные по определению минимальных бактерицидных концентраций и *in vitro* динамики гибели клеток (time-kill study) AZD0914 свидетельствуют о его бактерицидном действии. Тестирование синергизма с 17 антибиотиками методом шахматной доски *in vitro* показало только аддитивный или индифферентный эффект. Высокая *in vitro* антибактериальная активность, в т.ч. против устойчивых к фторхинолонам штаммов, низкая частота устойчивости, отсутствие перекрёстной устойчивости, бактерицидное действие AZD0914 являются основанием для продолжения его изучения.

* Infection iMed, AstraZeneca Pharmaceuticals LP, Waltham, Massachusetts, USA.

КОНЬЮГАЦИЯ МЕЖДУ ХИНОЛОНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ МОЖЕТ ПРИВОДИТЬ К МУТАЦИЯМ В ОБЛАСТИ,

ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЙ УСТОЙЧИВОСТЬ К ХИНОЛОНАМ (QRDR).

CONJUGATION BETWEEN QUINOLONE-SUSCEPTIBLE BACTERIA CAN GENERATE MUTATIONS IN THE QUINOLONE RESISTANCE-DETERMINING REGION, INDUCING QUINOLONE RESISTANCE/ A. PITONDO-SILVA, V. V. MARTINS, C. F?VERO DA SILVA, E. GUEDES STEHLING* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS FEBRUARY 2015; 45: 2: 119—123.

Хинолоны являются важной группой антибактериальных соединений, подавляющих активность ДНК гиразы и топоизомеразы IV. ДНК гираза, состоящая из субъединиц А и В, поддерживает отрицательно суперскрученное состояние. Топоизомераза IV является гомологом ДНК гиразы и содержит две субъединицы, кодируемые генами *parC* и *parE*. Мутации в *gyrA* и *gyrB* ДНК гиразы приводят к устойчивости к хинолонам. Большинство устойчивых штаммов содержит мутации между положениями 67 и 106 гена *gyrA*, т.е. в области, определяющей устойчивость к хинолонам (QRDR). Наиболее часто замещения наблюдаются в положениях 83 и 87. Механизм появления этих мутаций в QRDR малоизвестен. Полученные результаты свидетельствуют, что некоторые мутации в QRDR могут происходить в результате естественной конъюгации между бактериями в природной среде обитания. Это явление наблюдалось при *in vitro* конъюгации двух различных чувствительных к хинолонам (ХЧ) штаммов *Pseudomonas aeruginosa* с реципиентным ХЧ штаммом *Escherichia coli* (HB101) и заключалось в переносе подвижных плазмид разного молекулярного веса. В результате были получены два различных транс-конъюганта, содержащих мутации ДНК гиразы и устойчивые ко всем испытанным хинолонам.

* Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. do Café, s/n, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP CEP: 14040-903, Brazil.

ЦЕФТОБИПРОЛ И АМПИЦИЛЛИН ПОВЫШАЮТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДАПТОМИЦИНУ КАК ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ, ТАК И УСТОЙЧИВЫХ К ВАНКОМИЦИНУ ЭНТЕРОКОККОВ (VRE).

CEFTOBIPROLE AND AMPICILLIN INCREASE DAPTOMYCIN SUSCEPTIBILITY OF DAPTOMYCIN-SUSCEPTIBLE AND -RESISTANT VRE / B. J. WERTH, K. E. BARBER, K.-N. T. TRAN, P. NONEJUIE, G. SAKOULAS, J. POGLIANO, M. J. RYBAK* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 2: 489—493.

Установлено, что синергидная комбинация даптомицин-ампициллин эффективна в отношении VRE, включая не чувствительные к даптомицину штаммы. Цефтобипрол — цефалоспорин с широким диапазоном аффинитета к различного типа ПСБ энтерококков, включая ПСБ5. С точки зрения синергизма между бета-лактамами и даптомицином было интересно выяснить, есть ли какие-либо синергидные преимущества цефтобипрола в комбинации с даптомицином по сравнению с ампициллином. МПК даптомицина у 20 ампициллиноустойчивых VRE определяли методом разведений в бульоне при отсутствии или добавлении ампициллина или цефтобипрола. Синергидный эффект комбинации у 6 штаммов, включая 2 изогенных VR штамма *Enterococcus faecium* и 2 VR штамма *Enterococcus faecalis*, оценивали, определяя динамику гибели клеток (time-kill study) по снижению КОЕ/мл на $\geq 2 \log_{10}$ в сравнении с самой высокой активностью одного антибиотика. Количественно оценивали связывание даптомицина с комплексным флуоресцентным красителем в присутствии или отсутствии цефтобипрола. Значение МПК даптомицина находилось в пределах 2—256 мкг/мл. Добавление цефтобипрола или ампициллина снижало МПК на 3—4 $\log_2$ разведения соответственно. По данным «time-kill study» комбинация даптомицина с ампициллином или цефтобипролом оказывала синергидный эффект в отношении 4 различающихся между собой штаммов из 6. Обе комбинации были синергидны в отношении VR штаммов *E. faecalis*. Экспозиция с цефтобипролом увеличивала связывание комплекса даптомицина с флуоресцентным красителем в 2,8 раза ($p < 0,0001$). Таким образом, цефтобипрол в комбинации с даптомицином продемонстрировал сходную с ампициллином степень синергидного эффекта. В дальнейших исследованиях будут определены генетические и фенотипические свойства штаммов, для которых имеются преимущества цефтобипрола перед ампициллином.

* Anti-Infective Research Laboratory, Pharmacy Practice — 4148, Eugene Applebaum College of Pharmacy and Health Sciences, Wayne State University, 259 Mack Ave., Detroit, MI 48201, USA.

ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ АНАЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ КАК ИСТОЧНИК ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К БЕТАЛАКТАМАМ, СПОСОБСТВУЮЩИЙ РАЗВИТИЮ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ.

ORAL GRAM-NEGATIVE ANAEROBIC BACILLI AS A RESERVOIR OF β -LACTAM RESISTANCE GENES FACILITATING INFECTIONS WITH MULTIRESTANT

BACTERIA / C. DUPIN, Z. TAMANAI-SHACOORI, E. EHRMANN, A. DUPONT, F. BARLOY-HUBLER, L. BOUSARGHIN, M. BONNAURE-MALLET, A. JOLIVET-GOUGEON* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS FEBRUARY 2015; 45: 2: 99—202.

У различных грамотрицательных бактерий (*Capnocytophaga*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, etc.), обитающих в ротовой полости, описаны бета-лактамазы, принадлежащие к классу А по Ambler классификации (CepA, CblA, CfxA, CSP-1 и TEM), классу В (CfiA) или классу D у *Fusobacterium nucleatum* (FUS-1). Значения МПК бета-лактамов разнятся, и это часто зависит от присутствия плазмид или других подвижных генетических элементов (ПГЭ), модулирующих экспрессию генов устойчивости. Персистенция ДНК и бактериальное разнообразие в оральных биоплёнках также вносят свой вклад в генетическую трансформацию и конъюгацию в этом особом микромире. Сверхэкспрессия помповых насосов облегчена из-за локализации кодирующих генов на ПГЭ у некоторых мультирезистентных клинических штаммов, подобно конъюгативным транспозонам, содержащих гены, кодирующие бета-лактамазы. Все названные факты позволяют рассматривать ротовую полость как важный источник генов устойчивости к бета-лактамам и удобное место для генетического обмена, особенно у комменсальных строго анаэробных грамотрицательных бактерий.

* Equipe de Microbiologie, Université de Rennes, Rue Henri Guilloux, 1, 2, avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France.

IN VIVO АКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ ДАПТОМИЦИН-КОЛИСТИН ПРИ ТЕРАПИИ МОДЕЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ ACINETOBACTER BAUMANNII У GALLERIA MELLONELLA.

IN VIVO ACTIVITY OF DAPTOMYCIN/COLISTIN COMBINATION THERAPY IN A GALLERIA MELLONELLA MODEL OF ACINETOBACTER BAUMANNII INFECTION / H. YANG*, G. CHEN, L. HU, Y. LIU, J. CHENG, H. LI, Y. YE, J. LI*** // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS FEBRUARY 2015; 45: 2: 188—191.**

Антибиотикотерапия инфекций, вызванных *Acinetobacter baumannii* с мультилекарственной устойчивостью (MDR-AB), сталкивается с серьёзными проблемами. Практикующие врачи, несмотря на ограниченный арсенал средств, преодолевают их, применяя нестандартные комбинации разрешённых к назначению антибиотиков. Комбинация даптомицин-колистин, хотя и показала обнадежи-

вающие результаты в *in vitro* исследованиях, нуждается в дальнейших доклинических испытаниях. Для проверки *in vivo* эффективности данной комбинации использовали модель *A.baumannii* — *Galleria mellonella*. Определяли активность колистина одного и в комбинации с даптомицином в отношении *A.baumannii* штамма ATCC 19606 и MDR-AB клинического штамма GN2231, выделенного в Анжжу, Китай. Синергидный эффект определяли методом шахматной доски на микротитровальных чашках и по динамике гибели клеток (time-kill study). *In vivo* активность комбинации даптомицин-колистин оценивали на модельной *A.baumannii* инфекции у личинок *G.mellonella*. Комбинация антибиотиков оказывала бактерицидное действие на оба испытанных штамма. Комбинация даптомицина с колистином была высокоактивна (индекс фракционной ингибиторной концентрации, FICI, был <0,5). Обработка личинок *G.mellonella*, инфицированных летальными дозами *A.baumannii*, комбинацией даптомицин-колистин значительно увеличивала выживаемость по сравнению с обработкой одним колистином ($p<0,05$). Итак, комбинация даптомицина с колистином показала высокую активность *in vitro* и на *in vivo* модели инфекции у беспозвоночных.

* Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Jixi Road No. 218, Hefei, China.

** Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Jixi Road No. 218, Hefei, China. Tel.: +86 551 6292 2713; fax: +86 551 6292 2713.

*** Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Jixi Road No. 218, Hefei, China. Tel.: +86 551 6292 2713; fax: +86 551 6292 2713.

IN VITRO СИНЕРГИЗМ ПОЛИМИКСИНОВ В СОЧЕТАНИИ С ДРУГИМИ АНТИБИОТИКАМИ В ОТНОШЕНИИ ACINETOBACTER BAUMANNII: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР И МЕТА-АНАЛИЗ.

IN VITRO SYNERGY OF POLYMYXINS WITH OTHER ANTIBIOTICS FOR ACINETOBACTER BAUMANNII:

A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS / W. NI, X. SHAO, X. DI, J. CUI, R. WANG, Y. LIU*// INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS JANUARY 2015; 45: 1: 8—18.

Задачей работы было обеспечить подтверждения предварительным данным для руководств по рациональной комбинированной клинической антибиотикотерапии. Для этого на основе широкого поиска в литературе, охватывающего все регионы, виды и языки публикаций, был выполнен систематический обзор и мета-анализ исследований, оценивающих *in vitro* синергидную активность полимиксинов в комбинациях с другими антибиотиками в отношении *Acinetobacter baumannii*, а также методы *in vitro* тестирования синергизма. Первичным критерием оценки была *in vitro* активность комбинированной терапии, выраженная в бактерицидном или ингибирующем эффекте. Всего для обзора и анализа было включено 70 публикаций и 31 сообщение на конференциях, содержащие сведения по тестированию комбинаций полимиксина с антибиотиками 11 классов и 28 типов в отношении 1484 штаммов *A.baumannii*. Согласно данным динамики гибели клеток («time-kill study») наблюдалась высокая *in vitro* синергидная и бактерицидная активность комбинаций полимиксинов с карбапенемами и гликопептидами. Комбинация с карбапенемами или рифампицином эффективно подавляла развитие устойчивости к колистину и демонстрировала >50% степень синергидности в отношении колистиноустойчивых штаммов. Показатели синергидности большинства комбинаций антибиотиков, полученные методами шахматной доски и E-тестом, были значительно ниже показателей «time-kill study». Преимущества определённых комбинаций антибиотиков должны быть далее продемонстрированы в правильно спланированных клинических исследованиях.

* Department of Respiratory Diseases, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China.

Материал подготовлен Н. С. Бондаревой

