

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 61



3-4'2016

Научно-практический журнал

РАЗРАБОТКА И ПРОИЗВОДСТВО ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

НПП ФАРМАКЛОН®



**ЕДИНСТВЕННЫЙ В РОССИИ ПРЕПАРАТ
НА ОСНОВЕ ИНТЕРФЕРОНА ГАММА
ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО РЕКОМБИНАНТНОГО**



ИНГАРОН®

УНИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИНГАРОНА
ДОКАЗАНЫ КЛИНИЧЕСКИ

**иммуномодулирующая,
противовирусная,
противоопухолевая
активность**

**ВХОДИТ
В ПЕРЕЧЕНЬ
ЖНВЛП**



WWW.PHARMACLON.RU

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

«Antibiotics and Chemotherapy»

Issued 12 times a year
Since 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а.
ГНЦА

Тел.: 8-499-611-20-77

Факс: 8-499-611-42-38

E-mail: journalgnca@yandex.ru

Зав. редакцией Л. Б. Смирнова

Корректор: А. Н. Лобусева

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 2016

Типография:

ООО «Литера»

Дата выхода: 18.05.2016

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 61

3—4'2016

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. б. н. Полин А. Н.

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.

Бибикова М. В.

Васильев А. Н.

Волжанин В. М.

Дмитриева Н. В.

Долгова Г. В.

Захарова Ю. А.

Зуева Л. П.

Ильина Е. Н.

Клясова Г. А.

Ленёва И. А.

Митрохин С. Д.

Романцов М. Г.

Сычев Д. А.

Тец В. В.

Цыбанев А. А.

Ших Е. В.

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

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

Оригинальные статьи

Гулий О. И., Бунин В. Д., Игнатов О. В.
Метод электрооптического анализа для регистрации воздействия антибиотиков на микробные клетки
Кузнецова Т. А., Беседнова Н. Н., Запорожец Т. С., Ковалев Н. Н., Усов В. В., Земляной А. Б.
Биологически активные вещества из морских гидробионтов с антибактериальным действием в составе новых раневых покрытий
Можокина Г. Н., Елистратова Н. А.
Экспериментальное обоснование применения таурина для профилактики нейротоксических реакций, вызванных изониазидом

В помощь практикующему врачу

Катосова Л. К., Лазарева А. В., Хохлова Т. А., Пономаренко О. А., Алябьева Н. М.
Распространение и механизмы устойчивости к макролидам *Streptococcus pyogenes*, выделенных у детей

Обзоры

Смирнова И. П., Семкина О. А., Бондаренко О. В.
Использование растительных экстрактов в создании лекарственных средств разной терапевтической направленности
Хрянин А. А., Решетников О. В.
Интерферон-гамма: горизонты терапии
Богущ Т. А., Полежаев Б. Б., Дудко Е. А., Богущ Е. А., Кирсанов В. Ю., Полоцкий Б. Е., Тюляндин С. А., Давыдов М. И.
Новые данные о молекулярных мишенях тамоксифена, отличных от рецепторов эстрогенов, и их клиническая значимость

Original Papers

- 3 Guliy O. I., Bunin V. D., Ignatov O. V.
Electrooptical Assay for Record of Antibiotic Action on Microbial Cells
- 14 Kuznetsova T. A., Besednova N. N., Zaporozhets T. S., Kovalev N. N., Usov V. V., Zemlyanoi A. B.
Biologically Active Substances from Marine Hydrobionts with Antibacterial Activity in Composition of New Wound Dressings
- 19 Mozhokina G. N., Elistratova N. A.
Experimental Substantiation of Taurine Use in Prophylaxis of Isoniazid-Induced Neurotoxic Reactions

Guidelines for Practitioners

- 23 Katosova L. K., Lazareva A. V., Khokhlova T. A., Ponomarenko O. A., Alyabieva N. M.
Macrolide Resistance and Its Molecular Genetic Mechanisms in *Streptococcus pyogenes* Isolated from Children

Reviews

- 30 Smirnova I. P., Semkina O. A., Bondarenko O. V.
Plant Extracts in Development of Medicinal Products of Various Therapeutic Value
- 35 Khryanin A. A., Reshetnikov O. V.
Interferon-Gamma: Treatment Horizons
- 41 Bogush T. A., Polezhaev B. B., Dudko E. A., Bogush E. A., Kirsanov V. Yu., Polotsky B. E., Tjuljandin S. A., Davydov M. I.
New Data on Molecular Targets of Tamoxifen Besides Estrogen Receptors, Their Clinical Significance

По страницам журналов 50 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.

Метод электрооптического анализа для регистрации воздействия антибиотиков на микробные клетки

О. И. ГУЛИЙ^{1,2,3}, В. Д. БУНИН⁴, 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

Electrooptical Assay for Record of Antibiotic Action on Microbial Cells

O. I. GULIY^{1,2,3}, V. D. BUNIN⁴, O. V. IGNATOV¹

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov

² N.I.Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov

³ Saratov Research Veterinary Institute, Russian Academy of Sciences, Saratov

⁴ EloSystem GbR, Berlin

Одним из наиболее востребованных направлений в микробиологии является разработка быстрых и чувствительных методов определения устойчивости микробных клеток к антибактериальным препаратам. В работе рассмотрено решение этой проблемы при помощи метода электрооптического анализа, основанного на изменении электрофизических свойств суспендированных бактериальных клеток при воздействии на них антибиотиков с разным механизмом действия. Продemonстрирована возможность определения чувствительности микробных клеток к антибактериальным препаратам и определения их антибактериальной активности. Представленные результаты демонстрируют перспективность использования метода электрооптического анализа для решения вопросов антибиотикочувствительности микробных клеток для применения в микробиологии, медицине, ветеринарии.

Ключевые слова: *Escherichia coli*; электрооптические характеристики клеточных суспензий, антибактериальные препараты.

Development of rapid and sensitive procedures for determination of microbial resistance to antibiotics is one of the most urgent trends in microbiology. The problem is shown to be solved by using electrooptical assay based on change of the electrophysical properties of suspended bacterial cells exposed to antibiotics with different mechanisms of action. Possible determination of the microbial cell susceptibility to antibiotics and their antibacterial activity is demonstrated. The results showed the procedure of electrooptical assay to be prospective in solving the problem of the microbial cells antibiotic susceptibility in microbiology, medicine and veterinary.

Key words: *Escherichia coli*, electrooptical characteristics of cell suspensions, antibacterial agents.

Введение

Изучение адаптации микробов к действию антибиотиков является важной медико-биологической проблемой, поскольку появление резистентных форм микроорганизмов приводит к снижению их терапевтических свойств. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам является одним из диагностических методов, широко применяемым в терапии инфекционных заболеваний. Чувствительными к антибиотикам считаются те микроорганизмы, на которые испытуемый антибиотик оказывает бактериостатическое или бактерицидное действие. Мерой чувствительности микроорганизмов к антибиотикам является минимальная концентрация препарата,

подавляющая рост микроорганизма при стандартных условиях опыта.

В настоящее время для определения чувствительности микробов к антибиотикам используют стандартные методы диффузии в агар с применением дисков, методы серийных разведений, а также модификации этих стандартных методик [1]. Кроме того, созданы автоматизированные системы для определения антибиотикочувствительности бактерий. 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 посева)

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: E-mail: gulyi_olga@mail.ru

материала, инкубация, считывание результатов и их регистрация) [2, 3].

Анализ технологий, используемых для определения антибиотикочувствительности бактерий, например с помощью микробных биосенсорных систем [4–7], при помощи ВАСТЕС радиометрического метода [8], показывает, что основные проблемы данных методов состоят в сборе и подготовке образца, длительности получения результата, устранении ложноположительных результатов. Поэтому проблема разработки и развития новых технологий и методов определения чувствительности бактерий к действию антимикробных препаратов весьма актуальна для микробиологии, медицины и ветеринарии.

Действие антибиотиков может быть обусловлено различными факторами, которыми могут являться угнетение синтеза клеточной стенки,

ингибирование процессов синтеза белка и/или РНК, репликации ДНК, нарушение функционирования мембран. Некоторые антибиотики, представляющие собой отдельный класс данных соединений, являются антиметаболитами, действующими по типу конкурентных ингибиторов [3]. В результате воздействия антибиотиков на микробные клетки могут происходить изменения морфологии клеток, деструкция клеточной мембраны, изменения цитоплазматической мембраны и последующие нарушения биохимических процессов в этих клеточных структурах.

Общие теории действия лекарственных веществ основываются на представлении о связывании веществ со специфическим рецептором (часто мембранным белком), вызывающим биохимический отклик [9]. В результате происходит ускорение или замедление определённой реакции обмена

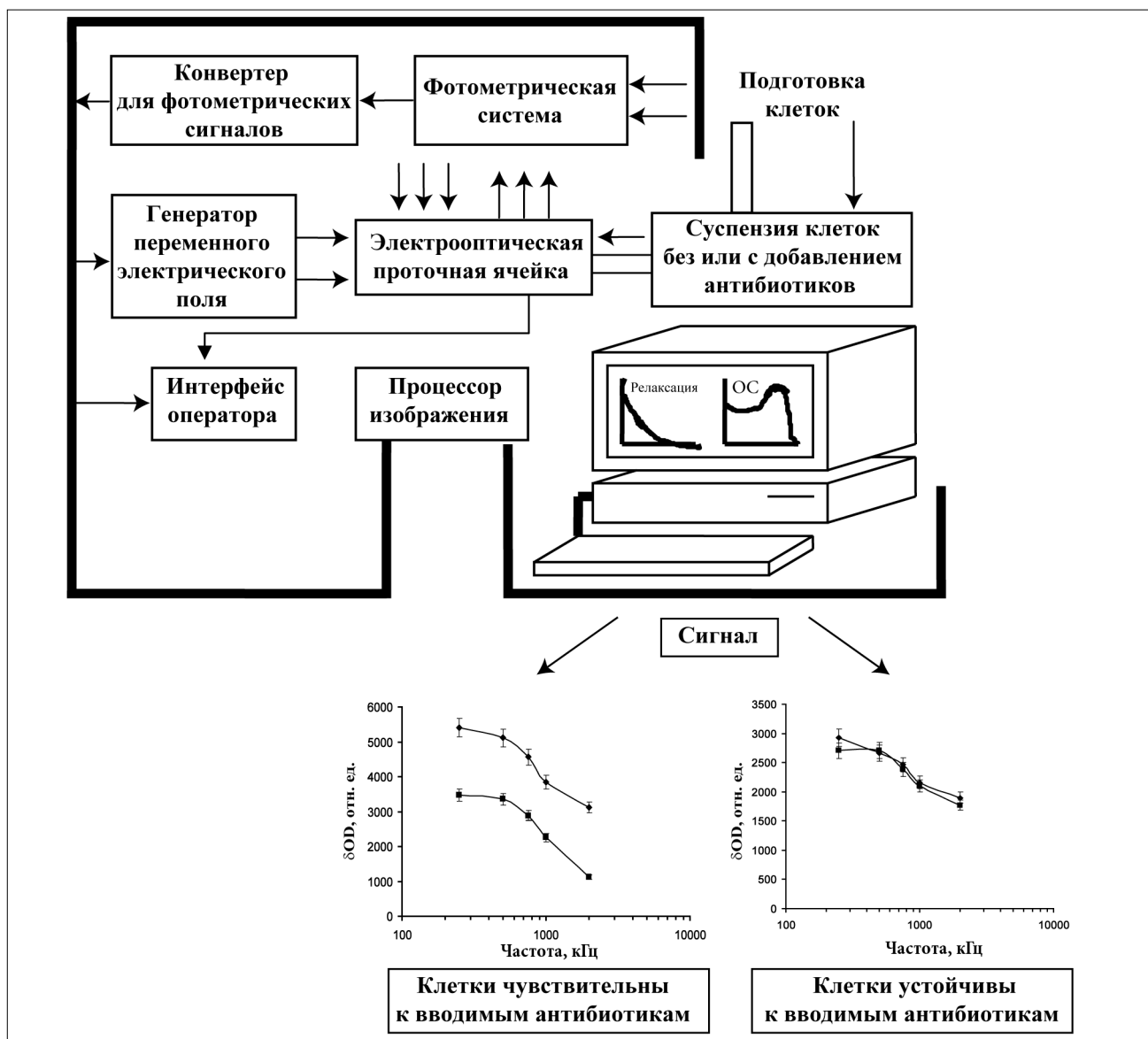


Рис. 1. Общая схема ЭО анализатора и проведения анализа.

или изменение проницаемости мембран по отношению к специфическим ионам или молекулам. Это, в свою очередь, может приводить к изменению электрофизических свойств микробных клеток, под которыми в данной работе подразумеваются удельная проводимость и диэлектрическая проницаемость клеточных структур.

Методы электрофизического анализа, основанные на исследовании клеток как электрофизических объектов со сложной структурой и измерении характеристик клеточных структур, представляют собой новый подход к оценке прижизненных физиологических параметров клеток и их гетерогенности [10–11]. Основными направлениями развития новых методов определения антибиотикочувствительности микробных клеток является использование метода электрооптического (ЭО) анализа. С помощью регистрации изменений ЭО характеристик клеточных суспензий можно сделать предварительные заключения о наличии (или отсутствии) устойчивости к данному антибиотику у исследуемых клеток.

Интегральным параметром, который охватывает все эти характеристики клеточных структур, является частотная дисперсия поляризуемости клетки (зависимость величины индуцированных зарядов от частоты электрического поля). В электрооптических измерениях этот параметр определяется прямым методом по изменению оптической плотности суспензии при воздействии на неё электрического поля и называется «ЭО сигнала или ЭО характеристики клеток».

Возможность применения метода ЭО анализа микробных клеток для определения их чувствительности к антибактериальным препаратам является актуальной и будет рассмотрена в данной работе. На основе собственных экспериментальных данных будут обобщены ранее полученные результаты и показаны области применения метода, в которых он является конкурентоспособным по сравнению с другими методами аналогичного назначения.

Идея экспериментов с использованием ЭО анализатора основана на том, что электрофизические свойства клеток после их взаимодействия с антибактериальными препаратами будут меняться, вызывая соответствующие изменения физических параметров клеточной суспензии, что позволит сделать заключение о чувствительности клеток к антибиотику.

В работе использованы представители разных классов антибиотиков с различными механизмами воздействия на микробные клетки: ампициллин, канамицин, хлорамфеникол, тетрациклин.

Поскольку перечисленные группы антибиотиков активны в отношении ряда грамотрицательных палочек, в качестве объекта исследования использовались микробные клетки *Escherichia coli*.

Материал и методы

В работе использовали бактерии *Escherichia coli* штаммов К-12, К-12 (pUC18), pMMB33, pBR325, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН, (Саратов).

Микробные клетки *E.coli* всех используемых штаммов выращивали на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): NaCl — 10; дрожжевой экстракт — 5; пептон — 5. Культивирование проводили в аэробных условиях на круговой качалке (160 об/мин) при постоянной температуре 30°C в течение суток. Выращенные клетки использовали для ЭО исследований.

Перед проведением анализа клетки отмывали трёхкратным центрифугированием при 2800×g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве дистиллированной воды (электропроводность 1,8 мкС/см). 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.

Измерения проводились на электрооптическом анализаторе ELUS, разработанном в Государственном научном центре при-

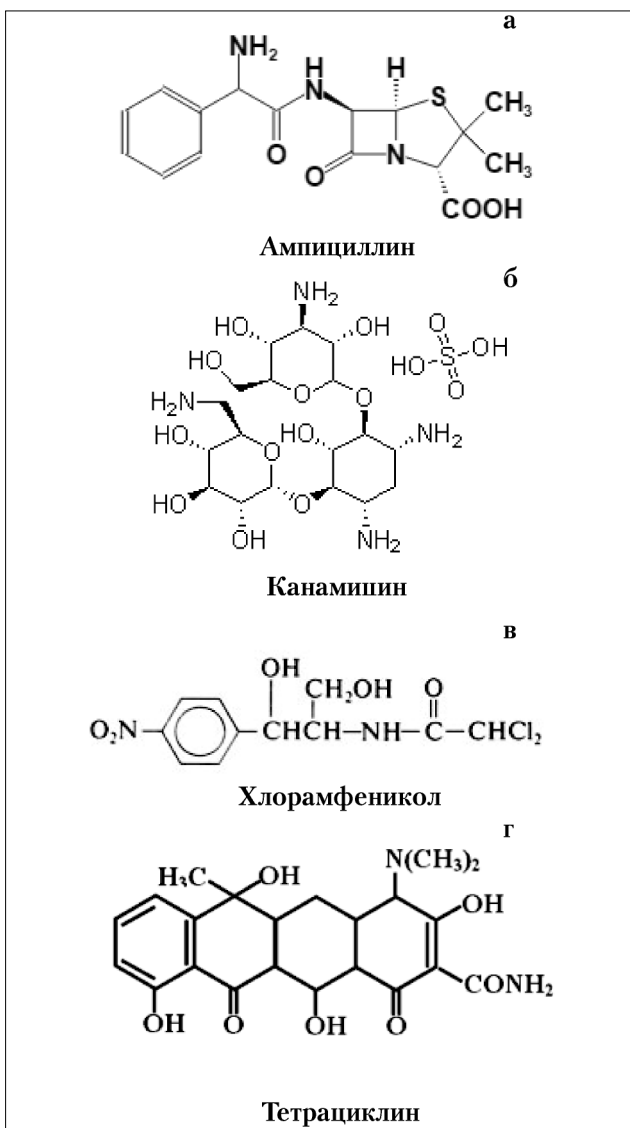


Рис. 2. Структурные формулы антибиотиков.

а — ампициллин; б — канамицин; в — хлорамфеникол; г — тетрациклин.

кладной микробиологии (Оболensk, Моск. обл.) при длине волны света 670 нм (относительно вакуума) по методике [10]. Общая схема анализатора и проведения экспериментов представлены на рис. 1. Использовали дискретный набор частот ориентирующего электрического поля: 10, 52, 104, 502, 1000, 5020, и 10 000 кГц. Ориентационный спектр (ОС) представлялся в виде зависимости разности значений оптической плотности суспензий (δOD) на длине волны 670 нм от частоты действующего 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 $\pm 3\%$.

В работе использовали следующие антибактериальные препараты: ампициллин (Sigma, США); канамицин (Sigma, США); хлорамфеникол (AppliChem, Германия); тетрациклин (AppliChem, Германия).

Структурные формулы использованных антибиотиков представлены на рис. 2.

Результаты исследования

1. Влияние β -лактамовых антибиотиков на электрооптические свойства микробных суспензий *E.coli*. Ампициллин ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$) относится к группе β -лактамовых антибиотиков и получается ацелированием 6-аминопенициллановой кислоты аминифенилуксусной кислотой. Активность β -лактамовых антибиотиков в значительной степени определяется их способностью взаимодействовать с клеточной поверхностью и изменять барьерные свойства цитоплазматической мембраны [2, 12].

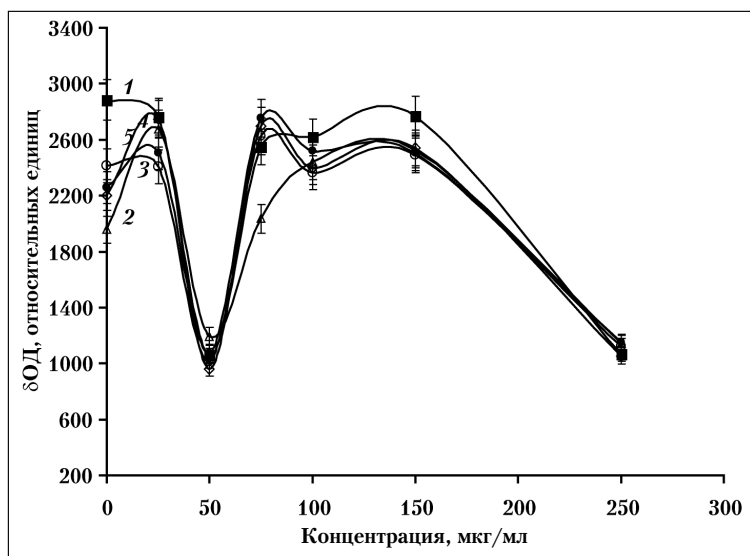


Рис. 3. Динамика изменения величины $\delta OD_{\text{контроль}} - \delta OD_{\text{эксперимент}}$ при частоте ориентирующего поля 52 кГц клеток *E.coli* K-12, инкубированных в дистиллированной воде с разными концентрациями ампициллина.

1 – 5 мин; 2 – 15 мин; 3 – 30 мин; 4 – 60 мин; 5 – 150 мин.

Нами изучались электрофизические свойства микробных клеток *E.coli* чувствительного (K-12) и резистентного K-12 (pUC18)) штаммов к ампициллину. Для этого в суспензию клеток *E.coli* штамма K-12, подготовленных для ЭО измерений, добавляли ампициллин до конечной концентрации 25, 50, 75, 100, 150 и 250 мкг/мл и инкубировали при 30°C в течение 5, 15, 30, 60 и 150 мин. Из представленных на рис. 3 данных видно, что изменения в ОС суспензий клеток K-12, инкубированных с различными концентрациями антибиотика, имели место на первых пяти частотах ориентирующего электрического поля (10–1000 кГц). На более высоких частотах существенных изменений не отмечено. Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина $\delta OD_{\text{контроль}} - \delta OD_{\text{эксперимент}}$ при частоте ориентирующего поля 52 кГц. Максимальное уменьшение величины ЭО сигнала происходит при концентрации ампициллина 50 мкг/мл, при этом с увеличением концентрации антибиотика изменения в ОС суспензий не зависели от времени воздействия. Считаем, что такая зависимость изменений величины ЭО сигнала связана с тем, что в зависимости от молекулярного механизма, антибиотики характеризуются бактерицидным и бактериостатическим действием. Ампициллин обладает бактерицидным действием, которое проявляется в концентрациях, в 2–10 раз превышающих бактериостатическое [12].

Бактериостатическое действие проявляется при действии низких концентраций β -лактамов, в результате чего клетки утрачивают способность к образованию перегородок в процессе деления, что препятствует процессу деления клеток и вызывает образование волокнистых бактерий. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток при использовании ампициллина в концентрации 25 мкг/мл, вероятно, обусловлено бактериостатическим действием антибиотика.

Бактерицидное действие ампициллина проявляется при увеличении концентрации антибиотика. При этом лизис клеток наступает за счёт того, что в момент деления клетки происходит деформация клеточной оболочки. В наших экспериментах бактериостатическая концентрация ампициллина (25 мкг/мл) была увеличена в 2 раза, в результате чего было показано значительное снижение величины ЭО сигнала при концентрации ампициллина 50 мкг/мл, что вероятно, связано с деформацией клеточной оболочки в момент деления клеток. При использовании высоких концентраций ампициллина

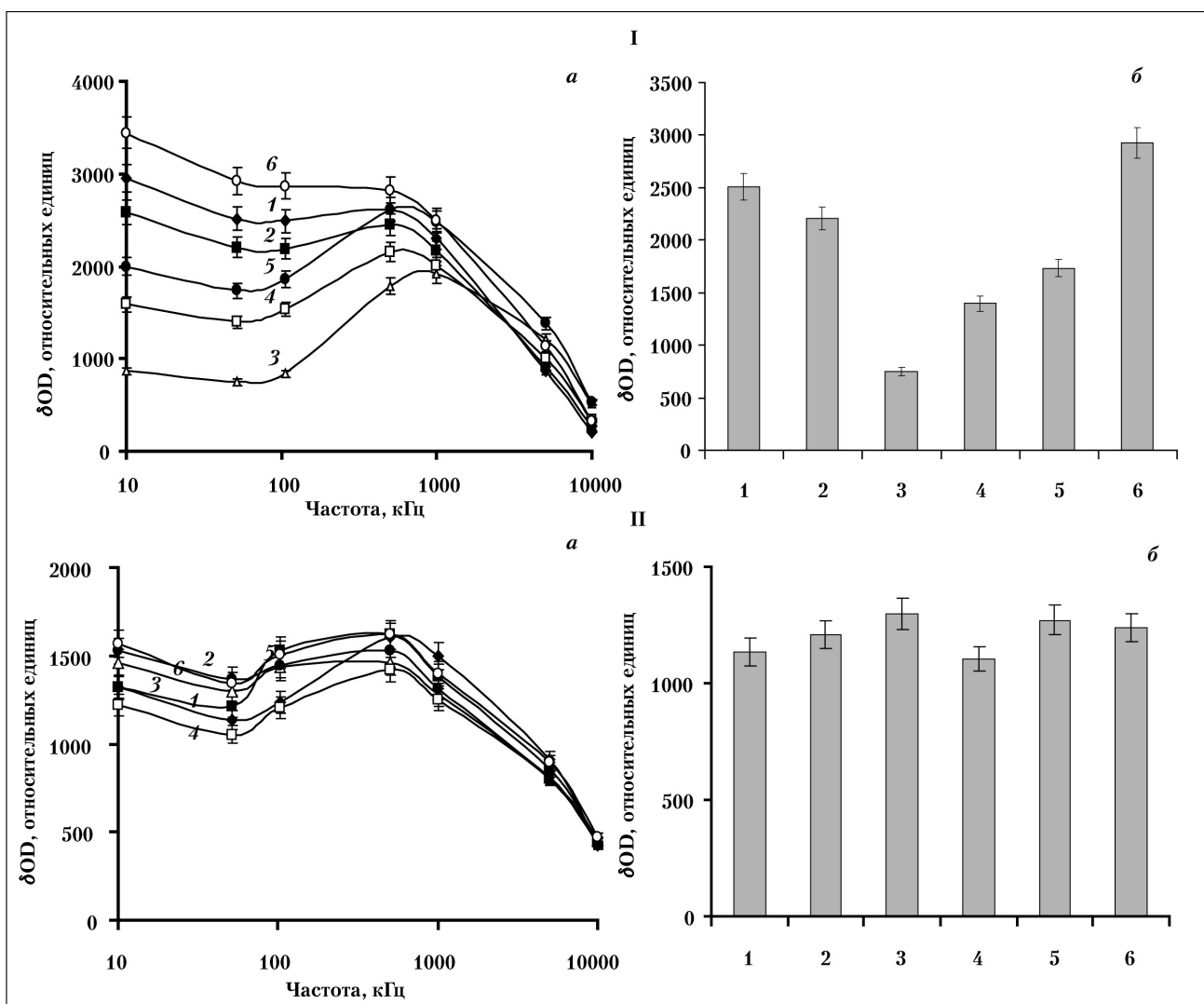


Рис. 4. Динамика изменения ОС (а) и изменение значений величины ЭО сигнала (б) при частоте ориентирующего поля 52 кГц суспензии клеток *E. coli* K-12 (I) и *E. coli* K-12 (pUC18) (II) при действии ампициллина (50 мкг/мл).

1 – клетки без добавления антибиотика (контроль); клетки с добавлением антибиотика: 2 – экспозиция 5 мин; 3 – 15 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; 6 – 150 мин.

гибель клеток наступает раньше, чем проявляется изменение их морфологических характеристик. При действии на клетки ампициллина в концентрации 75 мкг/мл, 100 мкг/мл и 150 мкг/мл наблюдалось постепенное увеличение величины ЭО сигнала в сравнении с используемой концентрацией антибиотика 50 мкг/мл. Полученные данные могут быть объяснены различным соотношением морфологически измененных и погибших клеток.

При воздействии на клетки ампициллина в концентрации 250 мкг/мл значительных изменений величины ЭО сигнала не зафиксировано, что, вероятно, связано с быстрой гибелью клеток при действии достаточно высоких концентраций антибиотика.

При изучении динамики воздействия ампициллина (50 мкг/мл) на изменения ОС клеточной

суспензии показано (рис. 4 (I)), что изменения в ОС наступают уже через 5 минут после обработки клеток антибиотиком. Это может быть объяснено поглощением антибиотика клеточной стенкой, поскольку известно, что антибиотик поглощается клеткой в течение 2 мин [13]. Максимальное снижение величины ЭО сигнала наблюдается через 15 мин воздействия антибиотика, что, возможно связано с деформацией клеточной стенки. Через 30 мин воздействия антибиотика происходит увеличение ЭО сигнала. Это согласуется с литературными данными о том, что максимальная активность данного антибиотика наблюдается после 30 мин его воздействия [13].

При исследовании изменений ЭО параметров суспензии клеток антибиотикостойчивого штамма *E. coli* K-12 (pUC18), обладающего плазмидой pUC18, несущей устойчивость к ампициллину,

было отмечено (рис. 4, II) незначительное увеличение величины ЭО сигнала после 5 мин инкубации с ампициллином. Однако, при дальнейшем воздействии ампициллина, существенных изменений ОС клеточной суспензии не происходит, что можно считать проявлением устойчивости данного штамма к действию ампициллина.

Увеличение величины ЭО сигнала через 5 мин инкубации обусловлено, вероятно, сорбцией антибиотика на клеточной поверхности, поскольку известно, что первый этап взаимодействия микроорганизмов с антибиотиком — адсорбция его клетками. Причем, ампициллин адсорбируется как чувствительными, так и устойчивыми к нему бактериями. Адсорбция происходит сразу же после внесения антибиотика в суспензию клеток, а процесс адсорбции ампициллина не зависит от концентрации антибиотика в среде [13].

Таким образом, при инкубации клеток ампициллиночувствительного штамма К-12 с ампициллином происходит значительное изменение величины ЭО сигнала. У микробных клеток ампициллиноустойчивого штамма К-12 (pUC18) существенных изменений ЭО параметров после инкубации с ампициллином не зафиксировано. Следовательно, зависимость ЭО сигнал клеток при действии ампициллина значительно отличается для чувствительных и резистентных штаммов *E.coli* [14].

2. Влияние аминогликозидных антибиотиков на электрооптические параметры микробных суспензий *E.coli*. Канамицин относится к аминогликозидным антибиотикам группы олигосахаридов. Основным механизмом его действия связан с нарушением белкового синтеза на стадии переноса аминокислот от аминоацил-тРНК на рибосомы. Канамицин способствует удержанию на рибосоме аминоацил-тРНК, не соответствующих кодону, установленному в А-участке рибосомы. В результате такого ложного кодирования синтезируются неправильные полипептиды с большим количеством ошибок, что и приводит к цитотоксическому (бактерицидному) эффекту на клетки [15].

При исследовании изменений ЭО параметров клеточной суспензии *E.coli* штамма К-12 при действии разных концентраций канамицина (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10, 15 и 20 мкг/мл) показано, что изменения в ОС суспензий клеток имели место на частотах ориентирующего электрического поля в интервале 10—1000 кГц. На более высоких частотах существенных изменений не отмечено. Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина ЭО сигнала при

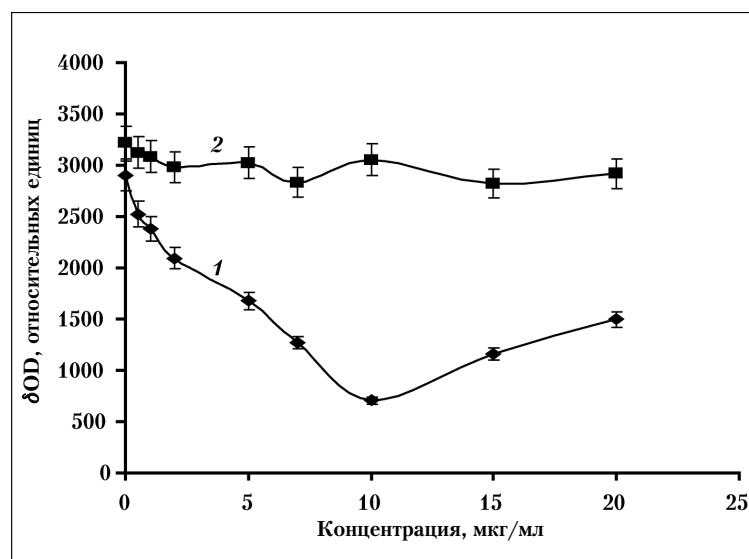


Рис. 5. Динамика изменения величины ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 52 кГц клеток *E.coli* К-12 (1) и *E.coli* К-12 (pММВ33) (2), инкубированных с разными концентрациями канамицина (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10, 15 и 20 мкг/мл).

частоте ориентирующего поля 52 кГц. Как видно из представленных данных (рис. 5, кривая 1), при добавлении к суспензии клеток указанных концентраций антибиотика происходит постепенное снижение величины ЭО сигнала, который достигает минимума при концентрации канамицина 10 мкг/мл. Механизм антимикробного действия канамицина связывают с подавлением белкового синтеза с последующим угнетением синтеза нуклеиновых кислот и нарушением образования клеточной стенки. Проникновение аминогликозидов через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий происходит через пориновые каналы, при этом вызывая частичную деструкцию мембраны и усиление проникновения аминогликозидов через этот барьер [16]. Таким образом, уменьшение величины ЭО сигнала клеток при концентрации канамицина 10 мкг/мл, возможно, обусловлено деструкцией мембраны клеток и бактерицидным действием антибиотика в отношении клеток *E.coli* штамма К-12.

Механизм устойчивости к канамицину обусловлен ферментативной инактивацией антибиотика в результате ацетилирования аминогруппы или фосфорилирования гидроксильной группы молекулы канамицина и определяется трансмиссивным R-фактором. В результате модификации канамицина ферментами бактерий происходит потеря активности антибиотика [3, 17]. При изучении изменений ЭО параметров клеточной суспензии канамициноустойчивого штамма *E.coli* pММВ33, обладающего плазмидой pММВ33, несущей устойчивость к канамицину, при действии

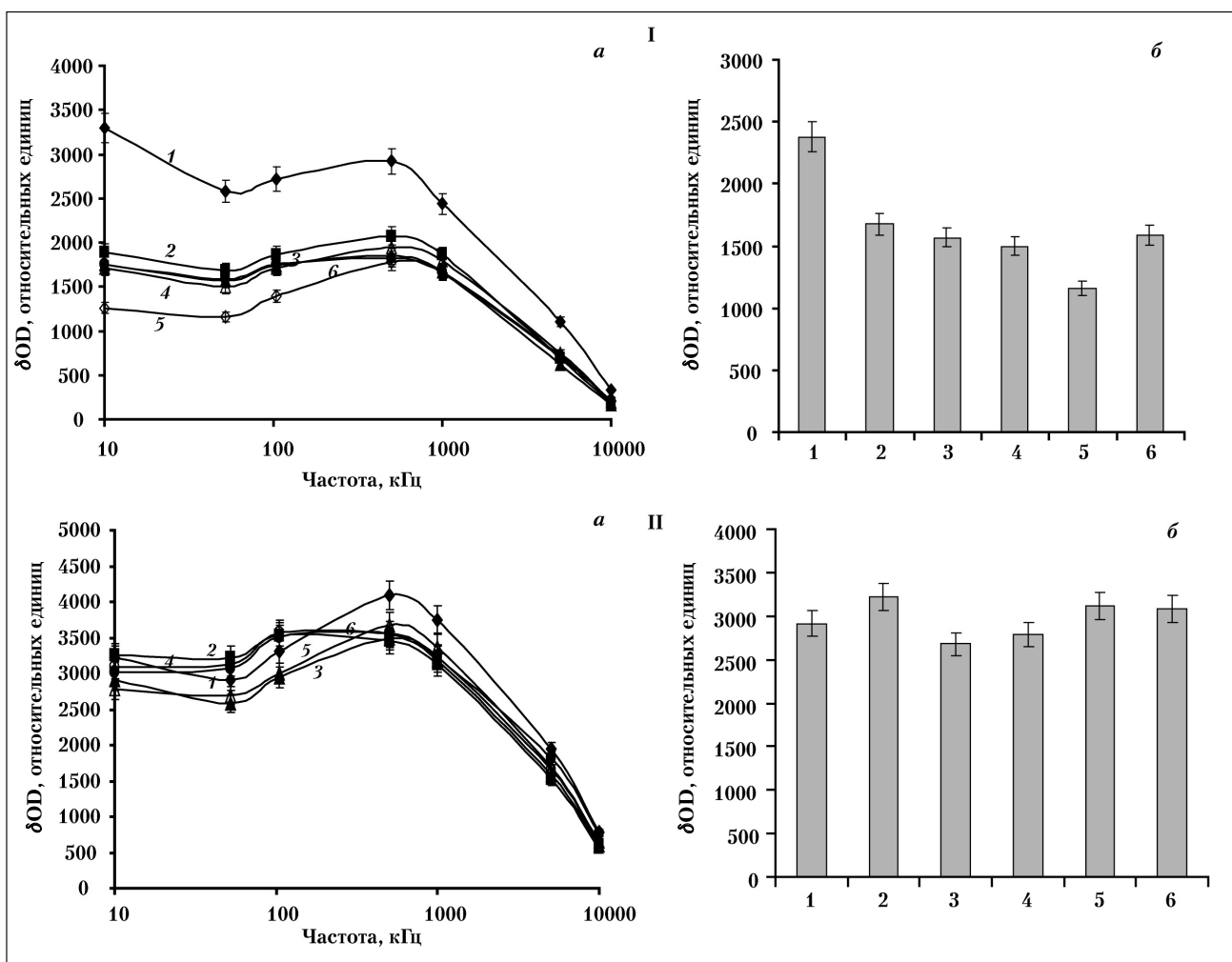


Рис. 6. Динамика изменений ОС (а) и величины ЭО сигнала (б) при частоте ориентирующего поля 52 кГц суспензий клеток *E. coli* K-12 (I) и *E. coli* K-12 (pMMB33) (II), инкубированных с канамицином (10 мкг/мл).

1 – клетки без добавления антибиотика (контроль); клетки с добавлением антибиотика: 2 – экспозиция 5 мин; 3 – 15 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; 6 – 150 мин.

разных концентраций канамицина (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10, 15 и 20 мкг/мл), продемонстрировано, что существенных изменений ОС клеточной суспензии при действии антибиотика не происходит (рис. 5, кривая 2). Полученные данные могут быть объяснены возможной инактивацией канамицина вследствие действия R-ферментов, фосфорилирующих канамицин, в результате чего происходит потеря активности антибиотика. Предположение согласуется с литературными данными, согласно которым, генетическая информация о синтезе R-ферментов контролируется генами, локализованными на хромосоме, плазидах или эписомах [2, 17]. В наших экспериментах использовался канамициноустойчивый штамм *E. coli* pMMB33, обладающих плазмидой pMMB33, несущей устойчивость к канамицину. Вероятно, генетическая информация о синтезе R-ферментов у микробных клеток данного штамма контролируется плазмидой pMMB33.

При изучении динамики изменений ОС клеток изучаемых штаммов при действии канамицина (10 мкг/мл) показано (рис. 6, I), что у микробных клеток канамициночувствительного штамма *E. coli* K-12 наблюдается уменьшение величины ЭО сигнала клеточной суспензии уже через 5 минут после обработки клеток антибиотиком. Это может быть объяснено частичной деструкцией клеточной мембраны и проникновением антибиотика в клетку. После 15 мин инкубации клеток с канамицином наблюдается дальнейшее постепенное уменьшение величины ЭО сигнала. Эти изменения величины ЭО сигнала клеточной суспензии естественно связать с отмеченными выше биохимическими процессами, происходящими в микробной клетке при действии канамицина и усилением проникновения антибиотика в клетку. Следовательно, регистрация изменений ЭО параметров клеточной суспензии K-12, происходящих при инкубации с канамици-

ном, может служить одним из показателей проникновения антибиотиков внутрь клетки штамма К-12 и его чувствительности по отношению к канамицину. У суспензии клеток канамициноустойчивого штамма *E.coli* рММВ33 при действии канамицина было отмечено незначительное увеличение величины ЭО сигнала после 5 мин инкубации с канамицином (рис. 6, II), при дальнейшей инкубации клеток с канамицином, существенных изменений ОС клеточной суспензии не происходит, что можно считать проявлением устойчивости данного штамма к действию канамицина.

Таким образом, показано, что зависимость ЭО эффекта микробных клеток при действии канамицина значительно отличается для чувствительных и резистентных штаммов *E.coli*. Изменения ОС суспензий при действии канамицина можно использовать в качестве теста устойчивости к данному антибиотику у исследуемых клеток [18].

3. Влияние хлорамфеникола на электрооптические свойства микробных суспензий *E.coli*. Особый интерес, с нашей точки зрения, представляет использование метода ЭО анализа клеточных суспензий при воздействии на них хлорамфеникола, являющегося ингибитором белкового синтеза и обладающего бактериостатическим эффектом воздействия на микробные клетки. Хлорамфеникол (левомицетин) специфический ингибитор пептидилтрансферазной реакции, протекающей в рибосомах [12, 15]. Основным механизмом его действия связан с нарушением синтеза на стадии переноса аминокислот от аминоацил-тРНК на рибосомы. Считается, что хлорамфеникол, связываясь с 50S-субъединицей рибосом, инактивирует пептидилтрансферазную реакцию, катализирующую образование пептидной связи в рибосомной системе белкового синтеза [3, 15]. Хлорамфеникол является антибиотиком широкого спектра действия и активен в отношении большого числа грамотрицательных палочек, что позволяет в качестве объекта исследования использовать микробные клетки *E.coli*.

При воздействии разных концентраций хлорамфеникола (0,5, 1,5, 2,5, 3, 6, 12, 24, 35, 50, 70 и 140 мкг/мл) на микробные клетки штамма К-12 отмечено, что изменения в ОС суспензий клеток при действии различных концентраций антибиотика, имели место на первых пяти частотах ориентирующего электрического поля 10-1000 кГц. На более высоких частотах существенных изменений не отмечено. При использовании малых концентраций антибиотика (0,5, 1,5, 2,5 мкг/мл), значительных изменений ОС клеток не зафикси-

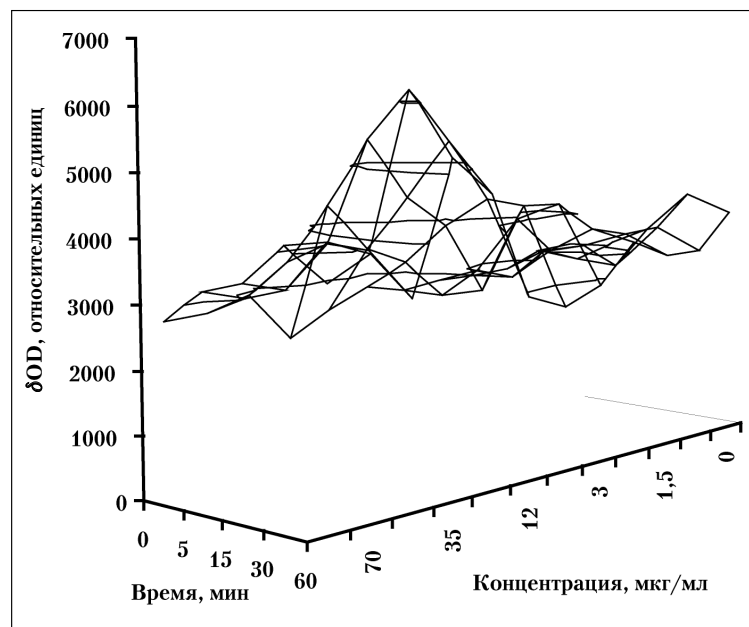


Рис. 7. Динамика изменения величины ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 52 кГц суспензии клеток *E.coli* К-12, при воздействии разных концентраций хлорамфеникола (0,5; 1,5; 2,5; 3,0; 6,0; 12; 24; 35; 50; 70 и 140 мкг/мл).

ровано. При увеличении концентрации хлорамфеникола (3, 6, 12, 24, 35 мкг/мл) регистрируются изменения величины ЭО сигнала (рис. 7). Для удобства представления экспериментальных данных использовали результаты исследования динамики изменений величины ЭО сигнала суспензий клеток *E.coli* К-12, при воздействии разных концентраций хлорамфеникола при частоте ориентирующего поля 52 кГц (рис. 7).

При изучении динамики изменений ОС клеток *E.coli* К-12 при действии хлорамфеникола в концентрации 35 мкг/мл показано (рис. 8, I), что после 5 мин воздействия антибиотика на микробные клетки происходит незначительное увеличение величины ЭО сигнала. После 15 и 30 мин инкубации клеток с хлорамфениколом происходит значительное увеличение величины ЭО сигнала. Дальнейшие изменения ЭО параметров клеточной суспензии незначительно зависят от времени воздействия антибиотика. Для удобства представления экспериментальных данных была использована величина ЭО сигнала при частоте ориентирующего поля 52 кГц (рис. 8, б). Увеличение величины ЭО сигнала после 15 и 30 мин воздействия антибиотика на клетки может быть объяснено длительностью его воздействия, биохимическими процессами, отмеченными выше, происходящими в микробной клетке при действии хлорамфеникола, и выходом из клетки макромолекул.

При изучении динамики изменений ЭО параметров клеточной суспензии хлорамфениколоустойчивого штамма *E.coli* рBR325 при действии

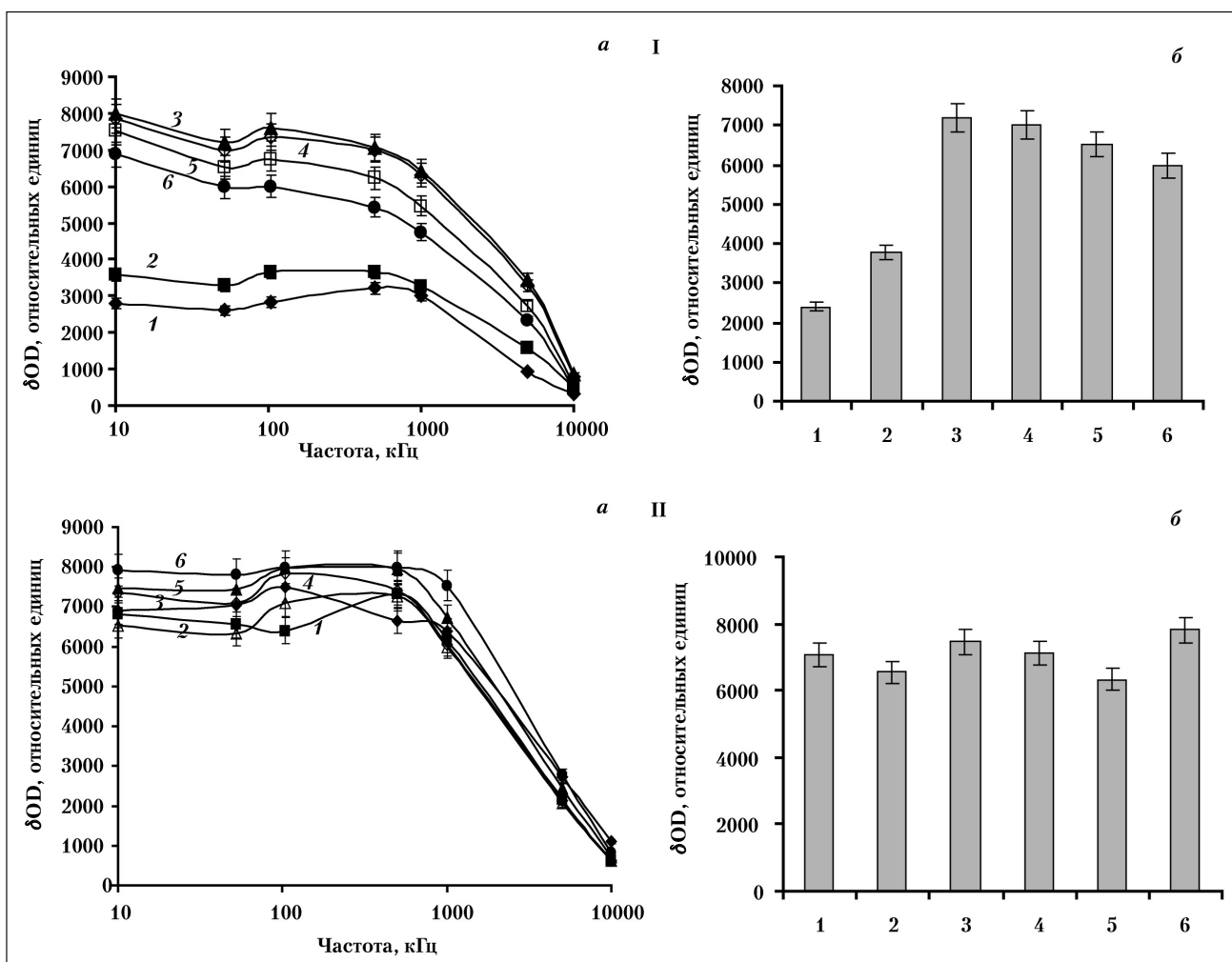


Рис. 8. Динамика изменений ОС (а) и величины ЭО сигнала (б) при частоте ориентирующего поля 52 кГц суспензии клеток *E.coli* K-12 (I) и *E.coli* K-12 (pBR325) (II) при воздействии хлорамфеникола (35 мкг/мл).

1 — клетки без добавления антибиотика (контроль); клетки с добавлением антибиотика: 2 — экспозиция 5 мин; 3 — 15 мин; 4 — 30 мин; 5 — 60 мин; 6 — 150 мин.

хлорамфеникола (35 мкг/мл) показано, что изменения величины ЭО сигнала после воздействия антибиотика незначительны независимо от времени воздействия антибиотика (рис. 8, II).

Таким образом, исследовано влияние хлорамфеникола на электрофизические свойства клеток *E.coli* чувствительного K-12 и устойчивого pBR325 штаммов к действию данного антибиотика [19].

4. Влияние тетрациклина на электрооптические свойства микробных суспензий *E.coli*. Тетрациклин — антибиотик широкого спектра действия. Механизм его воздействия обусловлен ингибированием связывания аминоацил-тРНК с А местом рибосомы на 30S рибосомной субъединице [13, 16]. Тетрациклин обладает близкой активностью в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных палочек. В низких концентрациях он характеризуется бактериостатическим действием. Предварительно нами проводились эксперименты по оценке из-

менений ЭО характеристик микробных клеток *E.coli* K-12 при действии разных концентраций тетрациклина. Минимальная подавляющая концентрация для большинства штаммов *E.coli* колеблется в пределах 1—25 мкг/мл, поэтому в наших экспериментах изучалась динамика изменений ЭО параметров клеток *E.coli* K-12 при действии тетрациклина в концентрациях (1,7 и 5,0 мкг/мл) в течении 5, 15, 30, 60 и 150 мин. Показано (рис. 9), что при действии используемых концентраций тетрациклина во всем исследуемом временном диапазоне значительных изменений ЭО параметров клеточной суспензии *E.coli* K-12 не происходит. Полученные результаты могут быть объяснены ограничением проникновения антибиотика внутрь клетки. Поскольку известно, что внешняя мембрана грамотрицательных бактерий может до известной степени ограничивать проникновение тетрациклина в клетку [16].

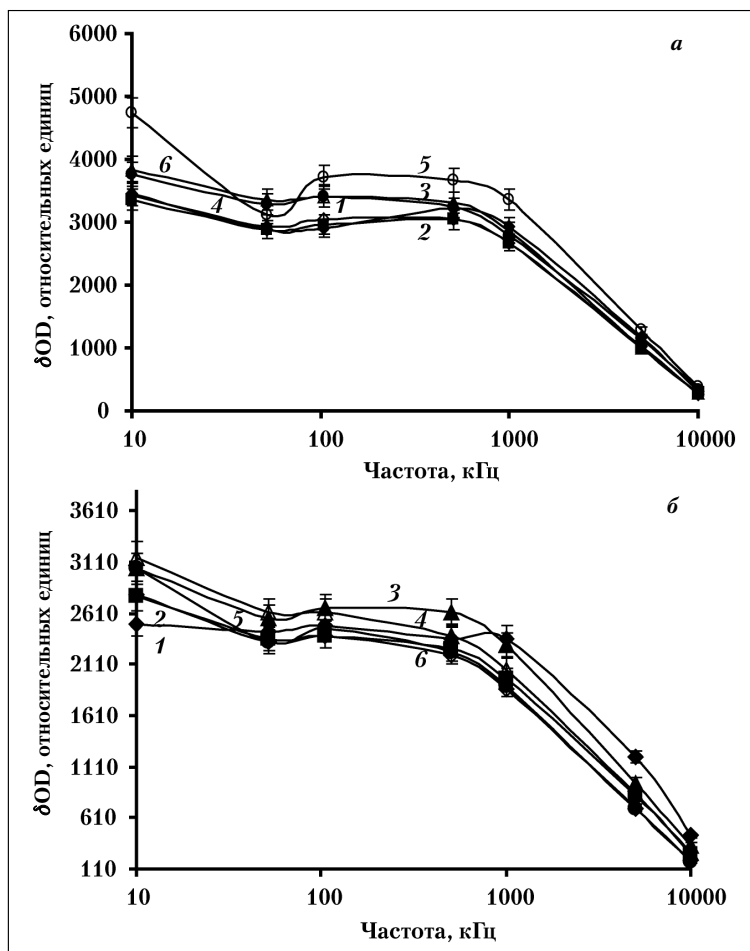


Рис. 9. Динамика изменения ОС суспензии клеток *E.coli* К-12 при действии разных концентраций тетрациклина (а) 1,7 мкг/мл, (б) 5,0 мкг/мл.

1 – клетки без добавления антибиотика (контроль); клетки с добавлением антибиотика: 2 – экспозиция 5 мин; 3 – 15 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; 6 – 150 мин.

Таким образом, тетрациклин в концентрациях 1,7 и 5,0 мкг/мл не действует на микробные клетки штамма К-12 и соответственно не фиксируются изменения ЭО параметров клеточных суспензий, т. е., микробные клетки *E.coli* К-12 являются устойчивыми к действию тетрациклина в используемых концентрациях [20].

Закключение

Таким образом, продемонстрированы возможности метода ЭО анализа микробных суспензий при воздействии антибиотиков с разным механизмом воздействия на микробные клетки. Показано, что зависимость ЭО сигнал суспензии клеток при действии антибиотиков ампицилли-

на, канамицина, хлорамфеникола и тетрациклина значительно отличается для клеток чувствительных и резистентных штаммов *E.coli*. Полученные данные могут быть использованы для создания нового метода определения чувствительности бактерий к действию антибиотиков с помощью электрооптического анализа клеточных суспензий. Для этого необходимо провести измерения ЭО параметров клеточных суспензий изучаемых штаммов после предварительно определенного времени воздействия антибиотиков в диапазоне активных концентраций антибиотика. На основании сравнения данных величины ЭО сигнала клеточных суспензий при действии антибиотика и контроля (суспензия клеток без антибиотика), можно сделать заключения о наличии устойчивости или чувствительности клеток изучаемого штамма.

В отличие от стандартных методов определения чувствительности бактерий к действию антибиотиков, использование метода ЭО анализа имеет ряд преимуществ, к которым относятся быстрота получения результата и относительная простота анализа, проведение анализа в минимальных объемах. Разрабатываемый подход может найти широкое применение в микробиологической, фармацевтической и биотехнологической промышленности, медицине и ветеринарии. Кроме того, описанный метод является прижизненным, не требует использования дополнительных меток или

химических компонентов, при этом воздействие на бактериальные клетки измерительной процедуры также незначительно. Метод является достаточно оперативным, т.к. время анализа составляет около ~10 мин, при этом процесс измерений может быть полностью автоматизирован. Описанный метод может дать полезную информацию и относительно биофизических аспектов воздействия антибактериальных препаратов на популяции микроорганизмов.

Таким образом, метод ЭО анализа является весьма перспективным для использования в микробиологии, медицине, ветеринарии для решения вопроса определения чувствительности микробных клеток к антибиотикам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы общей бактериологии: Пер. с англ./ Под ред. Ф. Герхарда. М.: Мир, 1984. / Metody obshhej bakteriologii: Per. s angl./ Pod red. F. Gerharda. M.: Mir, 1984. [in Russian]
2. Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Gillespie SH, McHugh TD (eds.), Methods in Molecular Biology, vol. 642, Springer Science+Business Media, LLC 2010.

3. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. М.: Мир, 1985; 272. / Lanchini D., Parenti F. Antibiotiki. M.: Mir, 1985; 272. [in Russian]
4. Galindo E., Bautista D., Garcia J.L., Quintero R. Microbial sensor for penicillins using a recombinant strain of *Escherichia coli* // Enzyme Microbial Technology. 1990; 12: 9: 642–646.
5. Fleschin S., Bala C., Bunaciu A.A., Panait A., AboulEnein H.Y. Enalapril microbial biosensor. Preparat Biochem Biotechnol 1998; 28: 3: 261–269.

6. Galindo E., Lagunas F., Osuna J., Soberon X., Garcia J.L. A microbial biosensor for 6-aminopenicillanic acid. *Enzym Microb Technol* 1998; 23: 331—334.
7. Antibiotic Resistance. Stephen H. Gillespie (ed.). *Method Mol Med* 2001; 48.
8. Cavalieri S. J., Biehle J. R., Sanders W. E. JR. Synergistic activities of clarithromycin and antituberculous drugs against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 7: 1542—1545.
9. Маршелл Э. Биофизическая химия. М.: Мир, 1981; 1: 347—358. / *Marshall Je. Biofizicheskaja himija. M.: Mir, 1981; 1: 347—358. [in Russian]*
10. Гулий О.И., Матора Л.Ю., Бурягин Г.Л., Дыкман Л.А., Игнатов В.В., Игнатов О.В. Электрооптические свойства микробных суспензий при взаимодействии клеток с антителами различной специфичности. *Приклад биохим микробиол* 2010; 46: 1: 69—72. / *Gulij O.I., Matora L.Ju., Burygin G.L., Dykman L.A., Ignatov V.V., Ignatov O.V. Jelektroopticheskie svojstva mikrobnih suspenzij pri vzaimodejstvii kletok s antitelami razlichnoj specifichnosti. Priklad biohim mikirobiol 2010; 46: 1: 69—72. [in Russian]*
11. Gulij O.I., Bunin V.D., O'Neil D., Ivniiski D., Ignatov O.V. A new electro-optical approach to rapid assay of cell viability. *Biosensor Bioelectron* 2007; 23: 583—587.
12. Бриан Л.Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам. М.: Медицина, 1984; 272. / *Brian L.E. Bakterial'naja rezistentnost' i chuvstvitel'nost' k himiopreparatam. M.: Medicina, 1984; 272. [in Russian]*
13. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Высшая школа, 2004; 528. / *Egorov N.S. Osnovy uchenija ob antibiotikah. M.: Vysshaja shkola, 2004; 528. [in Russian]*
14. Гулий О.И., Маркина Л. Н., Игнатов О.В., ШегOLEV C. Ю., Зайцева И. С., Бунин В.Д., Игнатов В.В. Влияние ампициллина на электрофизические свойства клеток *Escherichia coli*. *Микробиология* 2005; 74: 1: 126—131. / *Gulij O.I., Markina L. N., Ignatov O.V., Shhegolev C. Ju., Zajceva I. S., Bunin V.D., Ignatov V.V. Vlijanie ampicillina na jelektrofizicheskie svojstva kletok Escherichia coli. Mikrobiologija 2005; 74: 1: 126—131. [in Russian]*
15. Спири́н А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высшая школа, 1986; 303. / *Spirin A.S. Molekuljarnaja biologija. Struktura ribosomy i biosintez belka. M.: Vysshaja shkola, 1986; 303. [in Russian]*
16. Сазыкин Ю.О., Навашин П.С. Антибиотики и оболочка бактериальной клетки. *Итоги науки и техники. ВИНТИ. Серия Биотехнология. М.: 1991; 31: 187. / Sazykin Ju.O., Navashin P.S. Antibiotiki i obolochka bakterial'noj kletki. Itogi nauki i tehniki. VINITI. Serija Biotehnologija. M.: 1991; 31: 187. [in Russian]*
17. Кудлай Д.Г., Чубуков В., Оганесян М. Генетика лекарственной устойчивости бактерий. М.: Медицина, 1972; 255. / *Kudlaj D.G., Chubukov V., Oganessian M. Genetika lekarstvennoj ustojchivosti bakterij. M.: Medicina, 1972; 255. [in Russian]*
18. 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. / *Gulij O. I., Markina L. N., Bunin V. D., Ignatov V.V., Ignatov O. V. Issledovanie jelektroopticheskikh parametrov suspenzij kletok Escherichia coli pri dejstvii kanamicina. Mikrobiologija 2008; 77: 3: 380—385. [in Russian]*
19. Гулий О. И., Игнатов О. В., Маркина Л. Н., Бунин В. Д., ШегOLEV C. Ю., Игнатов В. В. Использование электрооптического анализа клеточной суспензии *Escherichia coli* для определения антибактериальной активности левомицетина. *Журн микробиол эпидемиол иммунол* 2006; 7: 12—16. / *Gulij O. I., Ignatov O. V., Markina L. N., Bunin V. D., Shhegolev S.Ju., Ignatov V. V. Ispol'zovanie jelektroopticheskogo analiza kletочноj suspenzii Escherichia coli dlja opredelenija antibakterial'noj aktivnosti levomicetina. Zhurn mikirobiol jepidemiol immunol 2006; 7: 12—16. [in Russian]*
20. Гулий О.И., Бунин В.Д., Ларионова О.С., Потемкина Е.Г., Балко А.Б., Игнатов О.В. Изменение электрофизических свойств клеток *Escherichia coli* при действии левомицетина и тетрациклина. *Антибиотики и химиотер* 2016; 61: 1—2: 3—8. / *Gulij O.I., Bunin V.D., Larionova O.S., Potemkina E.G., Balco A.B., Ignatov O.V. Izmenenie jelektrofizicheskikh svojstv kletok Escherichia coli pri dejstvii levomicetina i tetraciklina. Antibiotiki i himioter 2016; 61: 1—2: 3—8. [in Russian]*

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гулий Ольга Ивановна — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов; профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Саратовский государственный аграрный университет имени 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

Игнатов Олег Владимирович — д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов

Биологически активные вещества из морских гидробионтов с антибактериальным действием в составе новых раневых покрытий

Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹, Н. Н. КОВАЛЕВ², В. В. УСОВ², А. Б. ЗЕМЛЯНОЙ³

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

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

³ Московский государственный университет пищевых производств, Москва

Biologically Active Substances from Marine Hydrobionts with Antibacterial Activity in Composition of New Wound Dressings

T. A. KUZNETSOVA¹, N. N. BESEDNOVA¹, T. S. ZAPORozHETS¹, N. N. KOVALEV², V. V. USOV², A. B. ZEMLYANOI³

¹ G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² Far Eastern Federal University, Vladivostok

³ Moscow State University of Food Production, Moscow

Представлены данные по экспериментальному изучению эффективности гелевых форм раневых покрытий на основе хитозана и альгината кальция, содержащих биологически активные вещества из морских гидробионтов с комплексным терапевтическим действием (сульфатированные полисахариды из бурых водорослей, гидролизат из двустворчатых моллюсков, пептиды из нервных ганглиев головоногих моллюсков) на модели термического ожога, осложнённого инфицированием *Staphylococcus aureus*. С применением бактериологических и планиметрических методов исследования показано выраженное ранозаживляющее и антибактериальное действие испытуемых образцов гелевых покрытий. Наибольший эффект отмечен при лечении ожогов гелем, содержащим сульфатированные полисахариды из бурых водорослей.

Ключевые слова: биологически активные вещества из морских гидробионтов, хитозан, альгинат, сульфатированные полисахариды, антибиотики, стафилококк, термический ожог, гелевые раневые покрытия

The data on the experimental study of the efficacy of the gel wound dressings based on chitosan and calcium alginate containing bioactive substances from marine hydrobionts with complex therapeutic action (sulfated polysaccharides from brown algae, hydrolyzed bivalves, peptides from nerve ganglia of cephalopods) are described. The model of thermal burns complicated by *Staphylococcus aureus* infection was used. Planimetric and bacteriological investigations revealed pronounced wound healing and antibacterial effects of the gel coating. The gel containing sulfated polysaccharides from brown algae showed the highest wound healing activity.

Key words: biologically active substances from marine hydrobionts, chitosan, alginate, sulfated polysaccharides, antibiotics, *Staphylococcus*, thermal burn, gel wound dressings.

Биологически активные вещества (БАВ) из морских гидробионтов, являясь природными соединениями, оказывают ряд благоприятных физиологических эффектов в отношении различных систем макроорганизма, обладают высокой биосовместимостью и низкой токсичностью, безопасностью и хорошей переносимостью макроорганизмом, в связи с чем являются перспективными компонентами для разработки лекарственных препаратов и изделий медицинского назначения [1].

Нами разработаны гелевые формы раневых покрытий на основе хитозана и соли альгиновой

кислоты, содержащие в качестве биологически активных компонентов БАВ из морских гидробионтов (сульфатированные полисахариды из бурых водорослей, гидролизат из двустворчатых моллюсков, пептиды из нервных ганглиев головоногих моллюсков) [2]. Хитозаны широко используются в качестве основы раневых покрытий в связи с их безопасностью и биосовместимостью с тканями организма, высокой сорбционной и гемостатической способностью, а также иммуномодулирующей, антикоагулянтной, бактерицидной активностью [3, 4]. Альгинат кальция хорошо адсорбирует раневую экссудат и обладает высокой биологической активностью [3, 5].

Сульфатированные полисахариды из бурых водорослей (фукоиданы), проявляют антиагрегационное, антиоксидантное, антибактериальное,

© Коллектив авторов, 2016

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

иммуномодулирующее, антикоагулянтное, анти-токсическое [6–8], а также ранозаживляющее действие [9]. Другой компонент покрытий — гидролизат из двустворчатых моллюсков представляет собой биологически активный комплекс аминокислот и пептидов, насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот, микроэлементов и также обладает высокой биологической активностью, в первую очередь иммуномодулирующей и антиоксидантной [10]. Пептиды из нервных ганглиев головоногих моллюсков отличаются полифункциональностью действия практически в отношении всех функции организма. Главное преимущество природных регуляторных пептидов перед химическими препаратами состоит в том, что, являясь аналогами эндогенных соединений, они редко вызывают побочные реакции, и в большинстве случаев проявляют выраженный терапевтический эффект в сравнительно небольших дозах [11, 12].

Цель работы — оценка эффективности гелевых форм раневых покрытий на основе хитозана и альгината кальция, содержащих БАВ из морских гидробионтов (сульфатированные полисахариды из бурых водорослей, гидролизат из двустворчатых моллюсков, пептиды из нервных ганглиев головоногих моллюсков) в сравнении с мазью «Левомеколь», на модели термического ожога, осложнённого инфицированием раны.

Материал и методы

Эффективность гелей изучали на модели ожоговой раны III степени у мышей. В эксперименте использовали неинbredных мышей-самцов весом 22–25 г, которым наносили термический ожог медным стержнем с плоским торцом диаметром 1 см, нагретым на кипящей водяной бане, который на 10 сек прижимали к выбритому участку кожи в межлопаточной области. На 2-е сут после нанесения ожога в рану втирали взвесь суточной культуры *Staphylococcus aureus* 209-Р «Оксфорд» в физиологическом растворе ($0,5 \times 10^9$ микробных клеток в 1 мл) с последующим соответствующим (в зависимости от группы животных) лечением.

Результаты оценивали путём визуального наблюдения, измерения площади ожога и высеваемости из раны *S. aureus*. Планиметрические измерения проводили на 3-е, 7-е и 10-е сут после внесения микробной взвеси, определяли площадь (S) раневой поверхности и рассчитывали показатель заживления ран в процентах по формуле: $[(S \text{ ожога в 1-е сутки} - S \text{ ожога на текущие сутки}) \times 100\%] : S \text{ ожога в 1-е сутки}$. В эти же сроки производили мерный посев 10-кратных разведений гнойного отделяемого на мясо-пептонный агар и подсчёт выросших колоний (КОЕ/мл).

В исследовании были использованы 36 мышей, которые были разделены на 6 групп (по 6 в каждой). Были сформированы 3 контрольных группы: животным 1-й группы лечение не проводилось, животным 2-й группы местно применяли гель на основе хитозана и кальциевой соли альгиновой кислоты (гель), в 3-й группе использовали мазь «Левомеколь» («Нижфарм», Россия). Также были сформированы три опытных группы животных, которым местно применяли гель с добавками биологически активных веществ: сульфатированных полисахаридов (СПС) из бурых водорослей (*Saccharina japonica*) (4-я группа); гидролизата из мантии двустворчатых мол-

люсков (*Mizuhopecten yessoensis*) (5-я группа); пептидов из нервных ганглиев головоногих моллюсков (*Berryteuthis magister*) (6-я группа). Лечение животных начинали после инфицирования ожоговой раны.

Экспериментальные исследования выполнены с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах, выведение животных из эксперимента осуществляли с использованием эфирного наркоза.

Статистическую обработку цифровых данных проводили с помощью пакета программы «Statistica-7». Использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (для сравнения независимых выборок).

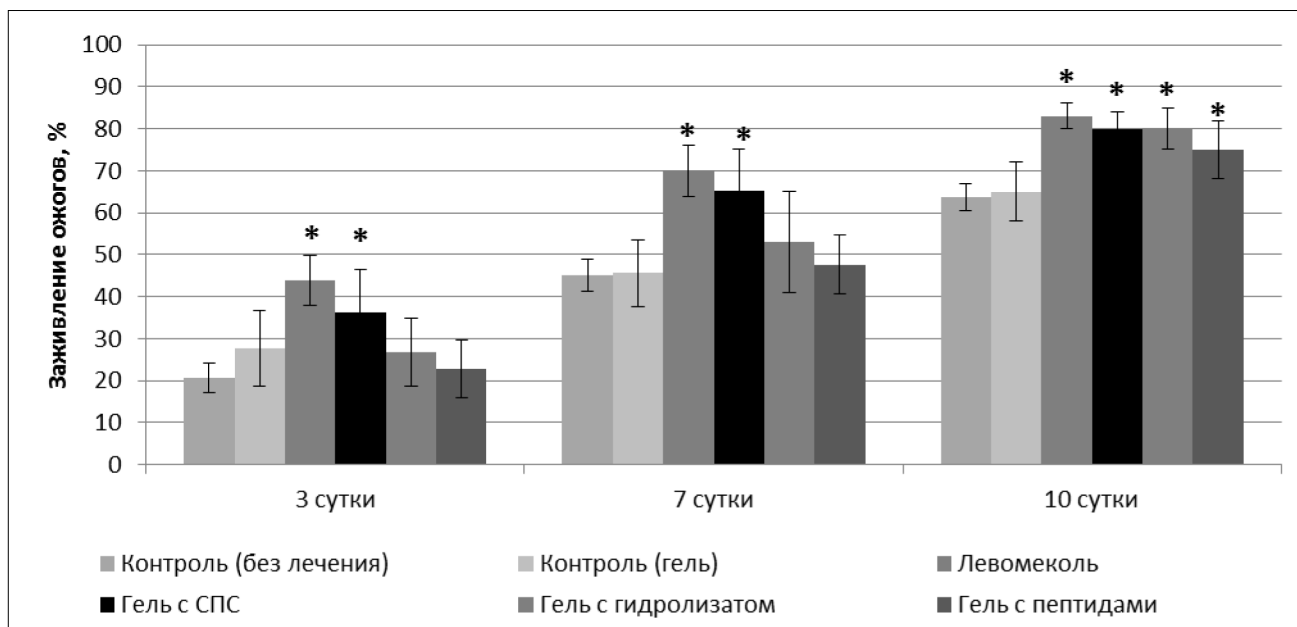
Результаты и обсуждение

Визуальное наблюдение за состоянием ожоговой раны показало, что у животных контрольной и опытных групп ожоговый струп формировался к концу 2-х суток. В динамике наблюдения установлено, что у животных, которых лечили мазью «Левомеколь» (3-я группа) и исследуемыми гелями (4–6 группы), отторжение ожогового струпа за счёт краевой эпителизации начиналось на 8–9-е сутки, что на 2–3 сут раньше, чем в 1-й и 2-й контрольных группах.

Различия в динамике заживления ожогов в контрольных и опытных группах подтверждаются данными планиметрических и бактериологических исследований. Так, согласно планиметрических показателей на 3-и и 7-е сут ранозаживляющий эффект отмечен только у животных, которых лечили мазью «Левомеколь» (3-я группа) и гелем, содержащим СПС из бурых водорослей (4-я группа), различия с контролем (1-я группа) статистически значимы ($p \leq 0,05$). На 10-е сут площадь раневого дефекта в 3–6-й группах была существенно меньше по сравнению с 1-й и 2-й группами ($p \leq 0,05$), что свидетельствует о выраженном лечебном действии мази «Левомеколь» и гелей с БАВ (рисунок).

Оценка ранозаживляющей активности испытуемых гелей по сравнению с мазью «Левомеколь» показала, что результаты лечения ожоговой раны мазью «Левомеколь» (3-я группа) и гелем с сульфатированными полисахаридами (4-я группа) были сопоставимы, т.е. не различались статистически ($p > 0,05$) на протяжении всего исследования. Так, на 7-е сут показатель заживления раны в этих группах составил $70,1 \pm 6,1\%$ и $65,3 \pm 11,1\%$, а на 10-е сут — $82,9 \pm 2,8\%$ и $79,9 \pm 4,2\%$ соответственно (см. рисунок).

Сравнительное исследование эффективности испытуемых гелей, применяемых в 4–6-й группах, показало, что наиболее значимые результаты лечения были получены при использовании геля с сульфатированными полисахаридами (4-я группа). Межгрупповые различия были наиболее выражены на 3-и и 7-е сут от начала лечения ($p \leq 0,05$). На 10-е сут площадь раневого дефекта во всех опытных группах сокращалась до сопоставимых значений (статистически значимых раз-



Динамика заживления инфицированных ожоговых ран у мышей при лечении гелями на основе БАВ из морских гидробионтов.

Примечание. Показатели $M \pm \delta$; $n=6$; (использовали критерий Манна-Уитни для независимых малых выборок); * — различия статистически значимы по сравнению с контролем (без лечения).

личий между 4—6-й группами не выявлено, $p > 0,05$) (см. рисунок).

Результаты бактериологического исследования динамики высеваемости *S. aureus* из отделяемого раны у животных испытываемых групп представлены в таблице. До начала лечения показатели микробной обсемененности у животных всех групп были однородны и составляли от $6,8 \times 10^6$ до $8,8 \times 10^6$ КОЕ/мл.

На 3-и сутки показатели микробной обсемененности раны при лечении мазью «Левомеколь» (3-я группа), составили $(16,8 \pm 3,9) \times 10^3$ КОЕ/мл, что значимо ниже ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными 1-й и 2-й группами. На 7-е и 10-е сутки в 3-й группе результаты высеваемости *S. aureus* также снижались по сравнению с 1-й и 2-й группами ($p < 0,05$) (таблица).

У животных, которых лечили гелем, содержащим сульфатированные полисахариды из бурых водорослей (4-я группа), показатели микробной обсемененности на всем протяжении исследования также были значимо ниже, чем в 1-й и 2-й группах ($p < 0,05$), но не отличались от значений в 3-й группе ($p > 0,05$) (см. таблицу).

Сравнение эффекта гелей с различными БАВ показало, что в результате лечения с применением геля, содержащего сульфатированные полисахариды, показатели высеваемости *S. aureus* из раны на всех сроках наблюдения были наименьшими и сопоставимыми с таковыми при лечении мазью «Левомеколь» (см. таблицу).

Экспериментальное испытание на модели инфицированной ожоговой раны III степени разработанных нами новых гелевых покрытий на основе хитозана и соли альгиновой кислоты, содержащих БАВ из морских гидробионтов, показало их положительное влияние на процессы регенерации. Полученные нами результаты планиметрических и бактериологических исследований свидетельствуют, что наибольший лечебный эффект, сопоставимый с применением мази «Левомеколь», показал гель с сульфатированными полисахаридами из бурых водорослей.

«Левомеколь» — комбинированный препарат, в состав которого входит антибиотик широкого спектра действия хлорамфеникол и стимулятор регенерации метилурацил. Чувствительность к действию этого препарата проявляют грамположительные аэробные и анаэробные бактерии, включая *Staphylococcus* spp., а также риккетсии, спирохеты и хламидии. Мазь рекомендована для лечения гнойных ран, трофических язв, ожогов 2—3 степени и других гнойно-воспалительных кожных заболеваний. Однако, несмотря на высокую эффективность, применение этой мази может вызвать ряд побочных эффектов, в т.ч. развитие аллергических реакций.

Разработанные нами гели содержат только компоненты природного происхождения из морских гидробионтов. Важное преимущество этих БАВ, в числе которых альгинаты, хитозаны, сульфатированные полисахариды, пептиды заключа-

Динамика высеваемости *S.aureus* у мышей на модели инфицированной ожоговой раны при лечении гелями на основе БАВ из морских гидробионтов

Группы животных	Высеваемость, КОЕ/мл		
	3-й день	7-й день	10-й день
1. Контроль (без лечения)	$(82 \pm 5,2) \times 10^3$	$(24 \pm 4,9) \times 10^2$	$(6,1 \pm 1,4) \times 10^2$
2. Контроль (гель)	$(85 \pm 4,1) \times 10^3$	$(21 \pm 2,9) \times 10^2$	$(1,12 \pm 0,29) \times 10^2$
	$p_{2-1} > 0,05$	$p_{2-1} > 0,05$	$p_{2-1} > 0,05$
	$p_{2-3} \leq 0,05$	$p_{2-3} \leq 0,05$	$p_{2-3} > 0,05$
	$p_{2-4} \leq 0,05$	$p_{2-4} \leq 0,05$	$p_{2-4} > 0,05$
	$p_{2-5} \leq 0,05$	$p_{2-5} \leq 0,05$	$p_{2-5} > 0,05$
	$p_{2-6} \leq 0,05$	$p_{2-6} > 0,05$	$p_{2-6} > 0,05$
3. Контроль (левомеколь)	$(16,8 \pm 3,9) \times 10^3$	$(1,8 \pm 2,9) \times 10^2$	$(0,57 \pm 0,17) \times 10^2$
	$p_{3-1} > 0,05$	$p_{3-1} < 0,05$	$p_{3-1} < 0,05$
	$p_{3-2} > 0,05$	$p_{3-2} < 0,05$	$p_{3-2} < 0,05$
	$p_{3-4} > 0,05$	$p_{3-4} > 0,05$	$p_{3-4} > 0,05$
	$p_{3-5} > 0,05$	$p_{3-5} \leq 0,05$	$p_{3-5} > 0,05$
	$p_{3-6} > 0,05$	$p_{3-6} \leq 0,05$	$p_{3-6} \leq 0,05$
4. Гель, содержащий сульфатированные полисахариды из бурых водорослей	$(9,5 \pm 1,9) \times 10^3$	$(1,7 \pm 0,24) \times 10^2$	$(0,98 \pm 0,17) \times 10^2$
	$p_{4-1} < 0,05$	$p_{4-1} < 0,05$	$p_{4-1} < 0,05$
	$p_{4-2} < 0,05$	$p_{4-2} < 0,05$	$p_{4-2} < 0,05$
	$p_{4-3} > 0,05$	$p_{4-3} > 0,05$	$p_{4-3} > 0,05$
	$p_{4-5} > 0,05$	$p_{4-5} < 0,05$	$p_{4-5} > 0,05$
	$p_{4-6} > 0,05$	$p_{4-6} < 0,05$	$p_{4-6} < 0,05$
5. Гель, содержащий гидролизат двусторчатых моллюсков	$(21 \pm 2,6) \times 10^3$	$(10,5 \pm 1,9) \times 10^2$	$(1,31 \pm 0,28) \times 10^2$
	$p_{5-1} < 0,05$	$p_{5-1} < 0,05$	$p_{5-1} < 0,05$
	$p_{5-2} > 0,05$	$p_{5-2} > 0,05$	$p_{5-2} > 0,05$
	$p_{5-3} > 0,05$	$p_{5-3} < 0,05$	$p_{5-3} > 0,05$
	$p_{5-4} > 0,05$	$p_{5-4} < 0,05$	$p_{5-4} > 0,05$
	$p_{5-6} > 0,05$	$p_{5-6} > 0,05$	$p_{5-6} > 0,05$
6. Гель, содержащий пептиды из нервных ганглиев головоногих моллюсков	$(29 \pm 4,8) \times 10^3$	$(13 \pm 3,3) \times 10^2$	$(5,6 \pm 0,92) \times 10^2$
	$p_{6-1} < 0,05$	$p_{6-1} > 0,05$	$p_{6-1} > 0,05$
	$p_{6-2} < 0,05$	$p_{6-2} > 0,05$	$p_{6-2} > 0,05$
	$p_{6-3} > 0,05$	$p_{6-3} < 0,05$	$p_{6-3} < 0,05$
	$p_{6-4} > 0,05$	$p_{6-4} < 0,05$	$p_{6-4} < 0,05$
	$p_{6-5} > 0,05$	$p_{6-5} > 0,05$	$p_{6-5} > 0,05$

Примечание. Показатели $M \pm \delta$; $n=5$; использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

ется в их высокой биологической активности, биосовместимости и низкой токсичности, безопасности, хорошей переносимости макроорганизмом [3–6, 11].

Многочисленными исследованиями доказано, что фукоиданы обладают большим потенциалом фармакологической активности, в спектре которой помимо широко известных противовоспалительной, иммуномодулирующей и противоопухолевой, немаловажное значение имеет антибактериальное, антиоксидантное, антиэндогенотоксическое действие.

Установлено что фукоиданы могут оказывать прямое бактериостатическое и бактерицидное действие в отношении различных микроорганизмов, патогенных для человека и животных. В их числе микроорганизмы с множественной лекарственной резистентностью *S.aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp. и др. [13–15].

Антибактериальные свойства фукоиданов часто сочетаются с их антиоксидантным действием. Так, фукоидан из бурой водоросли *Sargassum swartzii* проявил высокую антибактериальную активность в отношении 10 различных патогенных

для человека микроорганизмов, а также высокую антиоксидантную активность [16].

Немаловажным аспектом антимикробного действия полисахаридов морских водорослей является их способность ингибировать адгезию возбудителей к поверхности эукариотических клеток [14, 17]. Не меньшее значение имеет свойство сульфатированных полисахаридов препятствовать образованию микробных биоплёнок [18, 19], а также способность оказывать антиэндогенотоксическое действие [20, 21].

Благодаря этим свойствам сульфатированные полисахариды в составе разработанных нами гелевых покрытий способны обеспечивать комплексный ранозаживляющий и антимикробный эффект.

Заключение

Гели на основе хитозана и соли альгиновой кислоты, содержащие БАВ из морских гидробионтов, оказывают положительное влияние на процессы регенерации в инфицированную ожоговую рану.

Наибольший лечебный эффект с учётом показателей заживления ожоговой раны и высева-

емости *S.aureus*, сопоставимый с применением мази «Левомеколь», проявил гель с сульфатированными полисахаридами из бурых водорослей.

БАВ из морских гидробионтов (сульфатированные полисахариды из бурых водорослей, гид-

ролизат двустворчатых моллюсков, пептиды из нервных ганглиев головоногих моллюсков) могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения в качестве эффективных ранозаживляющих компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Беседнова Н.Н., Крыжановский С.П., Запорожец Т.С., Макаренко И.Д.* Биологически-активные вещества из морских гидробионтов — источник новых фармакологических субстанций и лекарств. Пробл стандартизации в здравоохранении 2011; 9—10: 27—33. / *Besednova N.N., Kryzhanovskij S.P., Zaporozhec T.S., Makarenkova I.D.* Biologicheski-aktivnyye veshchestva iz morskikh gidrobiontov — istochnik novykh farmakologicheskikh substancij i lekarstv. Probl standartizacii v zdravooohranenii 2011; 9—10: 27—33. [in Russian]
2. Патент РФ № 2545893. Способ приготовления геля для лечения ран и ожогов / Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Ковалев Н.Н. и др.; Зарегистрировано в Госреестре изобретений РФ 26 февраля 2015 г. / Patent RF № 2545893. Sposob prigotovlenija gelja dlja lechenija ran i ozhogov / Kuznecova T.A., Besednova N.N., Kovalev N.N. i dr.; Zaregistrovano v Gosreestre izobretenij RF 26 fevralja 2015 g. [in Russian]
3. *George M., Abraham T.E.* Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan — a review. J Control Release 2006; 114: 1—14.
4. *Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P.T. et al.* Novel Chitin and Chitosan Materials in Wound Dressing, Biomedical Engineering, Trends in Materials Science / Ed. by Mr Anthony Laskovski. 2011; 564.
5. *Dragnet K.I., Taylor C.* Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. Food Hydrocolloids 2011; 25: 251—256.
6. Фукоиданы — сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства. Владивосток: Дальнаука. 2014; 380. / *Fukoidany — sulfatirovannye polisaharidy buryh vodoroslej. Struktura, fermentativnaja transformacija i biologicheskie svojstva. Vladivostok: Dal'nauka. 2014; 380.* [in Russian]
7. *Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. Mar Drugs 2011; 9: 196—223.
8. *Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S.* Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydr Polym 2011; 84: 14—21.
9. *Murakami K., Aoki H., Nakamura S., Nakamura S.I. et al.* Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. Biomaterials 2010; 31: 83—90.
10. *Якушин С.В., Усов В.В., Полежаев А.А., Болохова И.Л.* Влияние топического применения иммуномодулятора и антиоксиданта на течение раневого процесса. Современные проблемы науки и образования 2012; 6: 16—21. / *Jakushin S.V., Usov V.V., Polezhaev A.A., Bolohova I.L.* Vlijanie topicheskogo primenenija immunomoduljatora i antioksidanta na techenie ranevogo processa. Sovremennye problemy nauki i obrazovanija 2012; 6: 16—21. [in Russian]
11. *Беседнова Н.Н., Энштейн Л.М.* Иммуноактивные пептиды из гидробионтов и наземных животных. Владивосток: ТИНРО-центр. 2004. 248. / *Besednova N.N., Jepshtejn L.M.* Immunoaktivnyye peptidy iz gidrobiontov i nazemnyh zhivotnyh. Vladivostok: TINRO-centr. 2004. 248. [in Russian]
12. *Бабиев Г.* Иммуноактивные пептиды и их координационные соединения в медицине. М.: 2009; 228. / *Babiev G.* Immunoaktivnyye peptidy i ih koordinacionnyye soedinenija v medicine. M.: 2009; 228. [in Russian]
13. *Lee K.-Y., Jeong M.-R., Choi S.-M. et al.* Synergistic effect of fucoidan with antibiotics against oral pathogenic bacteria. Arch Oral Biol 2013; 58: 5: 482—492.
14. *Marudhupandi T., Kumar T.T.A.* Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. Int Current Pharmaceutical J 2013; 2: 10: 156—158.
15. *Manikandan S., Ganesapandian S., Singh M. et al.* Antimicrobial activity of seaweeds against multidrug resistant strains. Int J Pharmacol 2011; 7: 522—526.
16. *Vijayabaskar P., Vaseela N., Thirumaran G.* Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. Chinese J Nat Med 2012; 10: 6: 421—428.
17. *Sebaaly C., Kassem S., Grishina E. et al.* Anticoagulant and antibacterial activities of polysaccharides of red algae *Corallina* collected from Lebanese coast. J App Pharmaceut Sci 2014; 4: 4: 30—37.
18. *Rendueles O., Kaplan J.B., Ghigo J.M.* Antibiofilm polysaccharides. Environ Microbiol 2013; 15: 2: 334—346.
19. *Camarota G., Laniro 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.
20. *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.
21. *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.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток

Беседнова Наталия Николаевна — Академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток

Запорожец Татьяна Станиславовна — д.м.н., ВРИО директора, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток

Ковалев Николай Николаевич — д.б.н., профессор кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук ДВФУ, Владивосток

Усов Виктор Васильевич — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической и экспериментальной хирургии Школы Биомедицины ДВФУ, Владивосток

Земляной Александр Борисович — д.м.н., профессор кафедры хирургии, Московский государственный университет пищевых производств Медицинский институт усовершенствования врачей, Москва

Экспериментальное обоснование применения таурина для профилактики нейротоксических реакций, вызванных изониазидом

Г. Н. МОЖОКИНА, Н. А. ЕЛИСТРАТОВА

НИИ фтизиопульмонологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва

Experimental Substantiation of Taurine Use in Prophylaxis of Isoniazid-Induced Neurotoxic Reactions

G. N. MOZHOKINA, N. A. ELISTRATOVA

Research Institute of Phthisiopulmonology, I. M. Sechenov 1st Moscow State Medical University, Moscow

В остром эксперименте на мышах изучено влияние таурина и витамина В₆ на клиническую картину и смертность животных, вызванных изониазидом. Использование таурина привело к уменьшению токсического действия изониазида, что проявилось задержкой развития судорог у мышей, ослаблением их длительности и повторности, снижением гибели животных от клонико-тонических судорог. Наиболее эффективно снижение нейротоксического действия изониазида было при использовании таурина в дозе 255 мг/кг. При совместном использовании таурина в этой дозе и витамина В₆ в профилактических дозах (1,3 или 3,9 мг/кг) гибели мышей от изониазида в условиях острого опыта не наблюдалось.

Ключевые слова: изониазид, острая токсичность, таурин, витамин В₆.

The effect of taurine and vitamin В₆ on the clinical process and mortality of experimental mice due to isoniazid was studied in an acute test. The use of taurine lowered the toxic effect of isoniazid, evident from delayed convulsions, their shorter time, rarer repeat and lower mortality of the animals due to tonic-clonic spasm. The most significant decrease of the neurotoxic effect of isoniazid was observed with the use of taurine in a dose of 255 mg/kg. When taurine in the dose of 255 mg/kg was used in combination with vitamin В₆ in prophylactic doses of 1.3 or 3.9 mg/kg, no death of the mice due to isoniazid in the acute test was recorded.

Key words: isoniazid, acute toxicity, taurine, vitamin В₆.

Одной из причин недостаточно высокой эффективности лечения такого социально значимого заболевания, как туберкулёз, являются частые побочные реакции на противотуберкулёзные препараты (ПТП). В схемы химиотерапии впервые выявленных больных туберкулёзом входит изониазид, наиболее эффективный из ПТП. Изониазид является производным гидразина, который относится к высокотоксичным веществам судорожного действия, угнетающим синтез гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) за счёт ингибирования декарбоксилазы глутаминовой кислоты (ДГК) путём антагонизма с пиридоксальфосфатом (коэнзим ДГК). Нарушая обмен витаминов группы В, глутаминовой кислоты, изониазид, проникая через гематоэнцефалический барьер, оказывает выраженное нейротоксическое действие, которое проявляется симптомами поражения центральной и перифери-

ческой нервной системы. Нейротоксичность изониазида у пациентов проявляется головной болью, повышенной раздражительностью, изменением настроения, нарушениями сна, в ряде случаев — судорогами [1].

Преодолеть токсическое действие изониазида можно путём увеличения синтеза ГАМК или повышения чувствительности нейронов к ней. Основным средством для снижения нейротоксических эффектов при использовании изониазида, особенно при его передозировке, является пиридоксин гидрохлорид (витамин В₆) [2]. Однако увеличение синтеза ГАМК с помощью одного витамина В₆ является недостаточно эффективным. Применение в клинике витамина В₆ не устраняло нейротоксические реакции изониазида у 20,5% больных [3]. В экспериментальных исследованиях было показано, что эффективность действия ГАМК на мембраны нервных клеток увеличивается под влиянием бензодиазепинов. При однократном внутривентральном введении мышам феназепама или диазепама отмечено снижение

© Коллектив авторов, 2016

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

Таблица 1. Схемы введения препаратов мышам

Препараты, дозы в мг/кг массы		
изониазид	витамин В ₆	таурин
200	—	—
200	1,3	—
200	3,9	—
200	7,8	—
200	—	190
200	—	255
200	1,3	190
200	3,9	190
200	1,3	255
200	3,9	255

острой токсичности изониазида (ЛД₅₀) с 190 до 495 мг/кг и со 136 до 350 мг/кг соответственно. Однако при многократном введении феназепама и диазепама с профилактической целью снижение ЛД₅₀ изониазида было менее значимым, что свидетельствует о нецелесообразности продолжительного приёма бензодиазепинов до начала лечения изониазидом. Введение транквилизаторов не исключает использование витамина В₆, поскольку его дефицит на фоне лечения изониазидом вызывает вегетативные расстройства в результате ингибирования моноаминоксидазы [4]. Таким образом, разработка новых способов профилактики нейротоксических реакций, развивающихся на фоне применения изониазида, сохраняет свою актуальность.

Наше внимание привлёк препарат таурин (2-амино-этансульфоновая кислота), обладающий свойствами нейромодулятора и антиоксиданта. Таурин, условно незаменимая аминокислота, представляет собой конечный продукт обмена серосодержащих аминокислот (метионина, гомоцистеина, цистеина) и содержится в больших концентрациях во всех тканях млекопитающих. Таурин является одной из наиболее распространённых аминокислот в ЦНС. В головном мозге таурин играет интегральную роль в таких физиологических процессах, как осморегуляция, нейропротекция, нейромодуляция. Он известен как положительный модулятор Cl⁻-каналов в составе ГАМК_A-ергических и глицинергических рецепторов, а также как отрицательный модулятор возбуждающих NMDA-рецепторов и Ca²⁺-каналов [5]. Антидепрессантное действие таурина было показано при экспериментальном стрессе [6], а также при экспериментальном диабете у крыс [7]. Изучен механизм антидепрессивного эффекта таурина при депрессии [8]. Приём таурина усиливает функцию ГАМК по защите ЦНС от избыточного количества возбуждающих нейротрансмиттеров, поэтому таурин является важным нейромодулятором для предотвращения чувства страха и беспокойства. В культуре клеток гиппокампа и нейронов коры головного мозга крыс показано нейропротективное действие таурина при эксайтотоксичности, вызванной глутаматом [9].

Цель настоящего исследования: разработка оптимальных способов профилактики нейротоксических реакций на изониазид с использованием таурина в остром эксперименте на мышах.

Материал и методы

Исследование проводили на половозрелых беспородных белых мышах обоего пола массой от 25 до 30 г, полученных из питомника «Андреевка». Животных содержали в стандартных клетках и на стандартном рационе. Доступ к воде и корму свободный. Во время эксперимента для исключения дополнительного раздражения каждое животное содержалось в отдельной клетке. После введения изониазида за мышами устанавливали наблюдение в течение 10 дней; в первые 6 часов наблюдали непрерывно. Оценивали поведение животных (активность, груминг), появление клонико-тонических судорог и гибель мышей от них.

Нейропротективный эффект одного таурина или в сочетании с витамином В₆ в условиях острого опыта оценивали по изменению картины токсического действия изониазида и частоты гибели мышей. Мыши были распределены на группы согласно схемам введения препаратов (табл. 1). В каждой группе было от 10 до 15 мышей.

Растворы изониазида, таурина и витамина В₆ вводили мышам однократно внутривентрикулярно с помощью зонда в объёме 0,5 мл. В схемах, где использовались сочетания препаратов, все составляющие вводились одновременно. Доза изониазида — 200 мг/кг массы. Витамин В₆ вводили в дозах 1,3, 3,9 и 7,8 мг/кг массы, что соответствует для человека профилактическим дозам 10, 30 мг и 60 мг, рекомендованным для коррекции нейротоксических реакций в клинике туберкулёза. Таурин использовали в дозах 190 или 255 мг/кг, что соответствует дозам 1500 или 2000 мг для человека.

Использовали: изониазид в таблетках (0,3 г) производства ОАО Мосхимфармпрепарат им. Н. А. Семашко; таурин (Дибикор) в таблетках (0,5 г) производства ООО ПИК-ФАРМА; витамин В₆ (пиридоксина гидрохлорид) в таблетках (0,01 г) производства ООО «Озон» (Россия).

Результаты и обсуждение

У животных, которым вводили изониазид, через 30–40 мин появлялось сильное возбуждение, усиление двигательной активности, далее (через 5–10 мин) появлялись клонико-тонические судороги. Более половины мышей (53,3%) погибли от острой дыхательной недостаточности, развившейся на пике клонико-тонических судорог (табл. 2). У выживших животных фаза возбуждения сменялась фазой угнетения. Мыши сидели неподвижно, корм и

Таблица 2. Проявления нейротоксического действия изониазида в дозе 200 мг/кг на фоне применения витамина В₆ или таурина.

Препараты, дозы (мг/кг)	Время до появления судорог, мин	Гибель мышей, %
Изониазид (200)	40—45	53,3
Изониазид + витамин В ₆ , (1,3)	60—80	44,4
Изониазид+ витамин В ₆ , (3,9)	60—80	44,4
Изониазид+ витамин В ₆ , (7,8)	60—80	0
Изониазид+ таурин (190)	80—100	33,3
Изониазид+ таурин (255)	80—100	16,6

Таблица 3. Проявления нейротоксического действия изониазида в дозе 200 мг/кг на фоне применения витамина В₆ в сочетании с таурином

Препараты, дозы (мг/кг)	Время до появления судорог, мин	Гибель мышей, %
Изониазид (200)	40—45	53,3
Изониазид + витамин В ₆ , (1,3)+таурин, (190)	80—100	20
Изониазид + витамин В ₆ , (1,3)+таурин, (255)	80—100	0
Изониазид+ витамин В ₆ , (3,9)+ таурин (190)	80—100	20
Изониазид+ витамин В ₆ , (3,9)+ таурин (255)	80—100	0

воду не потребляли. Явления интоксикации исчезали через сутки. В остальное время наблюдения (до 10 дней) гибели и изменения в поведении мышей не отмечалось.

Клиническая картина нейротоксического действия изониазида при совместном его использовании с витамином В₆ или таурином, или их сочетаний различалась по времени наступления судорожной активности и частоте гибели мышей во время клонико-тонических судорог (табл. 2).

При одновременном введении изониазида с витамином В₆ в дозах 1,3 и 3,9 мг/кг судорожная активность развивалась несколько позже (через 60—80 мин) по сравнению с использованием одного изониазида (40—45 мин). Частота гибели мышей от клонико-тонических судорог составила 44,4%, не зависела от дозы, и незначительно отличалась от показателя гибели от острой токсичности изониазида. При введении изониазида с витамином В₆ в дозе 7,8 мг/кг гибели мышей на фоне клонико-тонических судорог не было, в связи с чем в дальнейших схемах по совместному применению с таурином эта доза витамина В₆ не использовалась.

Использование таурина привело к уменьшению токсического действия изониазида, что проявилось задержкой развития судорог у мышей, ослаблением их длительности и повторности и снижением гибели животных. Так, смертность мышей от клонико-тонических судорог от изониазида при его совместном введении с таурином в дозах 190 и 255 мг/кг снизилась до 33,3 и 16,6% соответственно. Таким образом, снижение нейротоксического действия изониазида было наиболее выраженным при использовании таурина в дозе 255 мг/кг.

Наиболее значительно снизилась смертность мышей при применении витамина В₆ одновре-

менно с таурином (табл. 3). При сочетании таурина в дозе 190 мг/кг и витамина В₆ в дозах 1,3 или 3,9 мг/кг гибель мышей составляла 20%, что в 2 раза ниже, чем при использовании одного витамина В₆ и в 1,7 раза ниже по сравнению с использованием одного таурина. При сочетании таурина в дозе 255 мг/кг и витамина В₆ в обеих профилактических дозах гибели мышей не наблюдалось.

Таким образом, нейропротективное действие комплекса таурин (255 мг/кг) + витамин В₆ в профилактических дозах (1,3 или 3,9 мг/кг) оказалось эффективным для предотвращения гибели мышей от изониазида в условиях острого опыта. Добавление таурина значительно повысило нейрозащитный эффект низких доз витамина В₆.

Следует отметить, что таурин также обладает гепатопротективным действием в отношении гепатотоксичности изониазида. В исследовании [10], на изолированных гепатоцитах крыс показано, что 2-часовая инкубация с изониазидом в концентрации 10 ммоль/л приводит к гибели 50% клеток печени (DL₅₀). Таурин в концентрации 200 ммоль/л в 30-минутной преинкубации до внесения изониазида эффективно снижал его гепатотоксическое действие, связанное с накоплением продуктов перекисного окисления липидов и повреждением митохондрий.

Приведённые данные литературы и результаты нашего исследования могут быть экспериментальным обоснованием клинических рекомендаций [11] по применению таурина для снижения всего спектра реакций непереносимости ПТП (гепатотоксических, нефротоксических, кардиотоксических, нейротоксических, токсико-аллергических). Для повышения эффективности нейропротекторного действия таурина его следует назначать в комплексе с витамином В₆.

Закключение

Таурин усиливает нейрозащитное действие витамина В₆ при его использовании в достаточно низких, профилактических дозах, что проявляется в:

— уменьшении гибели животных от клонико-тонических судорог как проявления острой токсичности изониазида;

— повышении порога чувствительности к нейротоксическому действию изониазида (увеличивается интервал времени до появления первых судорог, снижается длительность и повторность судорог).

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколова Г.Б. Индивидуализированная химиотерапия туберкулёза лёгких (экспериментально-клинические исследования). Дисс. в виде научного доклада на соискание ученой степени д.м.н. М.: 2000; 67. / Sokolova G.B. Individualizirovannaja himioterapija tuberkuleza legkih (jeksperimental'no-klinicheskie issledovanija). Diss. v vide nauchnogo doklada na soiskanie uchenoj stepeni d.m.n. M.: 2000; 67. [in Russian]
2. Энциклопедия лекарств. РЛС-2008. 2007; 342—343. / Jenciklopedija lekarstv. RLS-2008. 2007; 342—343. [in Russian]
3. Соколова Г.Б., Зия А.В., Румянцев В.Б. О влиянии отечественного транквилизатора фенотропана для профилактики и лечения «острой» токсичности изониазида. Проблемы туберкулёза 1980; 3: 59—62. / Sokolova G.B., Zija A.V., Rumjancev V.B. O vlijanii otechestvennogo trankvilizatora fenotropana dlja profilaktiki i lechenija «ostroj» toksichnosti izoniazida// Problemy tuberkuleza 1980; 3: 59—62. [in Russian]
4. Соколова Г.Б., Куничан А.Д., Зия А.В., Можоккина Г.Н. Эффективные и щадящие режимы химиотерапии больных туберкулёзом лёгких. Пособие для врачей-фтизиатров. М.: 1998; 17. / Sokolova G.B., Kunichan A.D., Zija A.V., Mozhokina G.N. Jefferektivnye i shhadjashhie rezhimy himioterapii bol'nyh tuberkulezom legkih. Posobie dlja vrachej-ftiziatrov. M.: 1998; 17. [in Russian]
5. Olive M.F. Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system. Amino Acids 2002; 23: 4: 345—357.
6. Звягинцева Т.В., Киричек Л.Т., Кратенко А.С. Коррекция таурином состояния ЦНС, надпочечников и фагоцитарной активности при экспериментальном стрессе. Фармакология та лікарська токсикологія 2008; 5—6: 6—7: 58—63. / Zvjaginceva T.V., Kirichek L.T., Kratenko A.S. Korrekciija taurinom sostojanija CNS, nadpochechnikov i fagocitarnoj aktivnosti pri jeksperimental'nom stresse. Farmakologija ta likars'ka toksikologija 2008; 5—6: 6—7: 58—63.
7. Caletti G., Olguins D.B., Pedrollo E.F., Barros H.M., Gomez R. Antidepressant effect of taurine in diabetic rats. Amino Acids 2012 Oct; 43: 4: 1525—1533.
8. Toyoda A., Iio W. Antidepressant-like effect of chronic taurine administration and its hippocampal signal transduction in rats. Adv Exp Med Biol 2013; 775: 29—43.
9. Paula-Lima A.C., De Felice F.G., Brito-Moreira J., Ferreira S.T. Activation of gaba(a) receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. Neuropharmacology 2005 Dec; 49: 8: 1140—1148.
10. Reza Heidari et al. Cytoprotective effects of taurine against toxicity induced by isoniazid and hydrazine in isolated rat hepatocytes; Arh Hig Rada Toksikol 2013; 64: 201—210.
11. Способ снижения непереносимости противотуберкулёзных препаратов (<http://www.findpatent.ru/patent/241/2412701.html>)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Можоккина Галина Николаевна — д.м.н., зав. отделом лабораторно-диагностических методов исследования во фтизиатрии НИИ фтизиопульмонологии, Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Елистратова Н.А. — ст.н.с. лаборатории микробиологии и экспериментальной патологии отдела лабораторно-диагностических методов исследования во фтизиатрии НИИ фтизиопульмонологии, Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Распространение и механизмы устойчивости к макролидам *Streptococcus pyogenes*, выделенных у детей

Л. К. КАТОСОВА, А. В. ЛАЗАРЕВА, Т. А. ХОХЛОВА, О. А. ПОНОМАРЕНКО, Н. М. АЛЯБЬЕВА

Научный центр здоровья детей Минздрава России, Москва

Macrolide Resistance and Its Molecular Genetic Mechanisms in *Streptococcus pyogenes* Isolated from Children

L. K. KATOSOVA, A. V. LAZAREVA, T. A. KHOKHLOVA, O. A. PONOMARENKO, N. M. ALYABIEVA

Scientific Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Исследована частота и механизмы устойчивости к макролидам штаммов *Streptococcus pyogenes*, выделенных в три периода: 2011—2012 гг. (246 штаммов), 2013—2014 гг. (273 штамма) и с января по ноябрь 2015 г. (120 штаммов). Штаммы *S. pyogenes* (639) были выделены при культуральном исследовании 17107 мазков из зева, носа, вагины, отделяемого среднего уха, полученных от детей при консультативных поликлинических осмотрах и в соматических отделениях клиник. Чувствительность к макролидам и клиндамицину определяли диско-диффузионным методом и с помощью E-теста. Определение механизмов резистентности к макролидам и линкозамидам включало фенотипические и молекулярно-генетические методы. Гены резистентности (*ermB* и *mef*) к макролидам у 23 эритромицинорезистентных изолятов выявляли с помощью ПЦР. По сравнению с 2011—2012 гг. уровень резистентности возбудителя к эритромицину увеличился с 5 до 16%, к клиндамицину и 16-членным макролидам — с 2 до 10%. Среди 23 эритромицинорезистентных штаммов 6 (26,1%) имели М фенотип устойчивости, 3 (13,0%) — iMLS_B фенотип и 14 (60,9%) — cMLS_B фенотип. Результаты детекции генов, кодирующих резистентность *S. pyogenes* к макролидным антибиотикам, показали, что только 26,1% изолятов экспрессировали *mef* ген, у преобладающей части (65,2%) эритромицинорезистентных изолятов обнаружен *ermB* ген резистентности в качестве одной детерминанты и в 4,3% случаев *ermB* ген был в ассоциации с *mef* геном. У 1 изолята гены резистентности не были идентифицированы. Таким образом, основным механизмом, определяющим устойчивость *S. pyogenes* к макролидам, является метилирование рибосом, опосредованное *ermB* геном.

Ключевые слова: дети, *Streptococcus pyogenes*, макролиды, *mef* и *ermB*, гены резистентности.

The frequency and mechanisms of resistance to macrolides in *Streptococcus pyogenes* isolated within 3 periods: 2011—2012 (246 strains), 2013—2014 (273 strains) and from January to November of 2015 (120 strains) were studied. The strains of *S. pyogenes* (639) were isolated from 17107 nasopharyngeal, vaginal and middle ear discharge smears of children on their visits to physicians or hospitalization at somatic hospital departments. The susceptibility was tested by the disk diffusion method and E-test strips. Identification of the mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides included phenotypic and molecular genetic methods. PCR was used to determine *ermB* and *mef* genes in 23 erythromycin resistant isolates. As compared to 2011—2012, resistance of *S. pyogenes* to macrolides increased from 5 to 16% in 2015 and that to clindamycin from 2 to 10%. Among 23 erythromycin resistant strains 6 (26.1%) belonged to the M phenotype, 3 (13.0%) belonged to the iMLS_B phenotype and 14 (60.9%) belonged to the cMLS_B phenotype. The results of detecting the macrolide resistance genes in *S. pyogenes* showed that only 26.1% of the isolates expressed the *mefA* gene. The predominant share (65.2%) of the erythromycin resistant isolates possessed the *ermB* gene as a determinant and in 4.3% of the isolates the *ermB* gene was associated with the *mef* gene. No resistance genes were detected 1 isolate. Therefore, the main mechanism that determined resistance of *S. pyogenes* to macrolides was methylation of ribosomes mediated by the *ermB* gene.

Key words: children, *Streptococcus pyogenes*, macrolides, *mef*, *ermB* resistance genes.

Введение

Стрептококковые инфекции, вызванные *Streptococcus pyogenes* (β-гемолитический стрептококк серогруппы А — БГСА), имеют широкое распространение во всём мире, занимая значительную нишу в детском возрасте. Они вызывают различные патологические состояния, включая инвазивные и неинвазивные формы воспалитель-

ных заболеваний. Пиогенный стрептококк является возбудителем инфекционных поражений верхних дыхательных путей (тонзиллофарингиты, отиты), кожи и мягких тканей (пиодермия, импетиго, рожистое воспаление, некротический фасциит); ему отводится важная роль в этиологии скарлатины, эндокардита, гнойного артрита, остеомиелита, омфалита и тяжёлых генерализованных процессов с синдромом токсического шока [1—3]. Наблюдения последних лет показали возрастание (до 22%) роли *S. pyogenes* в этиологии острой отита у детей [4], особенно его тяжёлых форм,

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 119991, Россия, г. Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр. 1. Научный центр здоровья детей

при которых до 50% микробиоты, выделенной из полости среднего уха, занимал этот патоген [5]. Отмечено, что в этиологии вульвовагинитов у детей одним из ведущих возбудителей был *S.pyogenes*, занявший 2-е место по частоте выделения [6]. Наибольшее значение в детской патологии имеет стрептококковый тонзиллит [7]. Примерно до трети острых тонзиллитов имеет стрептококковую этиологию [3].

Учитывая сохраняющуюся до настоящего времени высокую чувствительность пиогенного стрептококка к бета-лактамам антибиотикам, пенициллины остаются универсальными препаратами выбора при лечении стрептококковых инфекций. В то же время при применении антибактериальной терапии стрептококкового тонзиллита пенициллинов известны случаи (24—30%) клинической и бактериологической неэффективности [2]. Неудачи лечения пеницилинами могут быть обусловлены несколькими причинами: разрушением незащищённых природных пенициллинов и аминопенициллинов (последние в значительной степени вытеснили природные пенициллины из повседневной практики) бета-лактамазами ко-патогенов, колонизирующих носоглотку, низкой комплаентностью пациентов при назначении 10-дневных курсов антибиотикотерапии, внутриклеточной локализацией микроорганизмов и др. [2, 8, 9]. Альтернативу пеницилинам составляют пероральные цефалоспорины, а при аллергии на бета-лактамы — макролидные антибиотики.

Основу химической структуры макролидных антибиотиков составляет макроциклическое лактонное кольцо, содержащее одну или несколько боковых углеводородных цепей. В зависимости от числа атомов углерода, содержащихся в лактонном кольце, различают 14-членные (эритромицин, кларитромицин, рокситромицин), 15-членные (азитромицин) и 16-членные (джозамицин, mideкамицин и спирамицин) макролидные антибиотики.

Макролиды относят к бактериостатическим антибиотикам, которые угнетают синтез белка за счёт связывания с 50S субъединицей рибосом. Резистентность к макролидам опосредуется двумя главными механизмами, к которым относятся модификация мишени действия антибиотиков и эффлюкс антибиотика из бактериальной клетки. Первый механизм обусловлен модификацией сайта связывания макролидов с 23S рРНК вследствие её метилирования, в результате которого нарушается взаимодействие антибиотика с мишенью [10, 11]. Метилирование осуществляется ферментом метилазой (аденозин-N-метилтрансфераза), который кодируется геном *erm* (англ. *erythromycin ribosome methylation*), и обуславливает высокий уровень устойчивости к макролидам (МПК > 32—64 мкг/мл). Ген ассоциирован с

транспозонами и может локализоваться как на плазидах, так и на хромосомах. Механизм устойчивости стрептококков, имеющих *ermB* ген, приводит к полной перекрёстной резистентности, охватывающей все макролиды, а также линкозамиды и стрептограмин В, поскольку их мишени частично перекрываются. Этот фенотип назван в честь антибиотиков MLS_B (macrolide, lincosamide, streptogramin B), к которым нечувствительны *ermB*-экспрессирующие бактерии.

Второй механизм резистентности к макролидам связан с их активным выведением (эффлюксом) макролидов из бактериальной клетки с помощью особой помпы, встроенной в клеточную стенку бактерий. Эффлюксная помпа кодируется несколькими вариантами гена *mef* (*macrolide efflux*). *mef*-позитивные стрептококки демонстрируют М фенотип, который характеризуется резистентностью к 14- и 15-членным макролидам при сохранении чувствительности к 16-членным макролидам, линкозамидам и стрептограмину В [12]. Для данного типа устойчивости характерны более низкие значения МПК эритромицина (4—32 мкг/мл). Ген *mef* локализован на хромосомах в составе конъюгативных элементов, что обеспечивает его эффлюксное внутри- и межвидовое распространение.

Существует два фенотипа экспрессии MLS_B резистентности: конститутивный и индуцибельный. При конститутивном фенотипе с MLS_B синтез метилазы не зависит от внешних условий и устойчивость микроорганизма распространяется на все группы макролидов и линкозамиды. Индуцибельный фенотип iMLS_B-устойчивости фенотипически проявляется устойчивостью к 14- и 15-членным макролидам при чувствительности или резистентности к 16-членным макролидам и линкозамидам, формируемой лишь после индукции.

До недавнего времени *S.pyogenes* характеризовался высоким уровнем чувствительности к представителям данной группы антимикробных препаратов. Однако широкое использование макролидов, в первую очередь азалида, особенно в педиатрической практике, привело к возникновению устойчивости микроорганизма к этим препаратам и линкозамидам. Частота распространённости макролидорезистентных штаммов пиогенного стрептококка и механизмы их приобретённой резистентности широко варьирует в различных странах, зависят от периода циркуляции и от уровня потребления макролидных антибиотиков.

Бактериологическую и клиническую эффективность препаратов, входящих в группу макролидных антибиотиков, определяет механизм формирования резистентности. Выявление фенотипа резистентности *S.pyogenes* к эритромицину и связанного с ним гена имеет клиническое

Таблица 1. Динамика резистентности к антибиотикам штаммов *S.pyogenes*, выделенных в три периода наблюдения (2011—2015 гг.)

Антибиотик	2011—2012 гг. (I)		2013—2014 гг. (II)		2015 г. (III)		p
	число штаммов	из них нечувствительные, абс. (%)	число штаммов	из них нечувствительные, абс. (%)	число штаммов	из них нечувствительные, абс. (%)	
Эритромицин	246	12 (4,9)	273	41 (15,0)	120	21 (17,5)	$p_{I-II} < 0,001$ $p_{I-III} < 0,001$ $p_{II-III} > 0,05$
Азитромицин	246	16 (6,5)	273	41 (15,0)	—	—	$p_{I-II} < 0,001$
Кларитромицин	256	7 (2,8)	270	29 (10,7)	—	—	$p_{I-II} < 0,001$
Клиндамицин	246	6 (2,4)	261	10 (3,8)	120	11 (9,2)	$p_{I-II} > 0,05$ $p_{I-III} < 0,05$ $p_{II-III} > 0,05$

Примечание. Согласно рекомендации EUCAST 2014 интерпретация результатов определения чувствительности к 14- и 15-членным макролидам (азитромицину, кларитромицину и эритромицину) в 2015 г. проводилась на основании результатов определения чувствительности к эритромицину.

значение для выбора стартового макролида, поскольку по преобладающему в конкретном регионе механизму резистентности возможно предсказать преимущество 16-членных макролидов.

Целью работы было определение уровня устойчивости изолятов *S.pyogenes* к макролидным антибиотикам и выявление ведущих молекулярно-генетических механизмов резистентности.

Материал и методы

Изучение частоты и молекулярных механизмов резистентности *S.pyogenes* к макролидам и линкозамиду проходило в три периода: 1-й — 2011—2012 гг. (246 штаммов), 2-й — 2013—2014 гг. (273 штамма) и 3-й — с января по ноябрь 2015 г. (120 штаммов). Все (639) исследованные за эти периоды штаммы *S.pyogenes* были выделены при культуральном исследовании 17107 мазков из зева, носа, вагины, отделяемого среднего уха, полученных от детей при консультативных поликлинических осмотрах и в соматических отделениях клиник. Для посева использовали 5% кровяной агар. Идентификацию *S.pyogenes* проводили общепринятыми в микробиологии методами, используя диски с бацитрацином, реакцию латекс-агглютинации (Slidex strepto-kit, bioMerieux), и на анализаторе MALDI-TOF MS (Microflex, Bruker Daltonics).

Чувствительность к макролидным антибиотикам и клиндамицину определяли диско-диффузионным методом (диски BioRad) на среде Мюллера—Хинтона с добавлением 5% крови. У 23 макролидорезистентных изолятов *S.pyogenes*, выделенных в 2015 г. (21 штамм) и в 2014 г. (2 штамма), определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) эритромицина и клиндамицина с помощью эспилометрического метода — Е-теста (bioMerieux). Интерпретацию результатов определения чувствительности штаммов *S.pyogenes* к антибиотикам проводили, используя критерии Европейского Комитета по определению чувствительности (EUCAST, 2014) [13]. Результаты чувствительности *S.pyogenes* к азитромицину и кларитромицину, полученные диско-диффузионным методом, интерпретировали по МУК 4.2. 1890-04 [14] в связи с отсутствием соответствующих критериев в стандартах EUCAST. Интерпретация результатов определения чувствительности изолятов к спирамицину проводилась согласно стандартам комитета по антибиограммам Французского общества микробиологов (CASFM-2012) [15]. К категории «нечувствительный» мы относили изоляты, обладавшие умеренным и высоким уровнем резистентности. При определении механизмов резистентности к макролидам и линкозами-

дам включали фенотипические и молекулярно-генетические методы. Фенотип индуцибельного типа резистентности (β -MLS_B) к 16-членным макролидам и линкозамидам определяли с помощью двойных дисков (эритромицин + клиндамицин) диффузионным методом [16]. Гены резистентности к макролидам (*ermB* и *mef*) у 23 эритромицинорезистентных изолятов выявляли с помощью ПЦР, для этого были использованы праймеры, предложенные R. R. Reinert и соавт. [17].

Статистический анализ достоверности различий между выборочными относительными величинами проводили по критерию Стьюдента [18].

Результаты исследования

Результаты исследования, проведенного в период 2011—2015 гг., позволили выявить рост резистентности *S.pyogenes* как к отдельным макролидным препаратам, так и к клиндамицину (табл. 1). В I временном интервале (2011—2012 гг.) доля штаммов *S.pyogenes*, не чувствительных (резистентных и умеренно резистентных) к эритромицину, азитромицину, кларитромицину и клиндамицину (маркёру устойчивости к джозамицину и другим 16-членным макролидам), находилась на низком уровне и составила 4,9, 6,5, 2,8 и 2,4% соответственно. Во II периоде (2013—2014 гг.) частота выделения устойчивых штаммов возрасла более чем в 2 раза и составила в отношении перечисленных антибиотиков 13,5, 13,5 и 9,2%. Однако к клиндамицину и 16-членным макролидам она по-прежнему сохранялась на низком уровне (3,8%). Для последнего наблюдаемого периода (2015 г.) был характерен продолжающийся рост устойчивости *S.pyogenes* к эритромицину, достигший 16,3%, и резкий подъём устойчивости к клиндамицину (до 9,8%).

Результаты (табл. 2) определения фенотипа устойчивости у 23 эритромицинорезистентных изолятов, выделенных в 2014—2015 гг. (2 изолята выделены в 2014 г. и 21 — в 2015 г.) показали, что 6 (26,1%) из них имели М фенотип, 3 (13,0%) — iMLS_B фенотип и 14 (60,9%) — cMLS_B фенотип. У изолятов с М фенотипом резистентности МПК эритромицина колебалась от 6 до 32 мг/л, у штам-

Таблица 2. Распределение фенотипов, генов резистентности и показателей МПК эритромицина и клиндамицина у макролидорезистентных изолятов *S.pyogenes*

Фенотип резистентности (число изолятов)	Ген резистентности (число изолятов)	Антибиотик	МПК, мг/л *
М фенотип, n=6	<i>mef</i> (n=6)	Эритромицин	6–32
		Клиндамицин	0,047–0,125
iMLS _B , n=3	<i>ermB</i> (n=3)	Эритромицин	256–>256
		Клиндамицин	0,19–0,94
cMLS _B , n=14	<i>ermB</i> (n=12)	Эритромицин	128–>256
		Клиндамицин	0,75–>256
	<i>ermB</i> +/ <i>mef</i> + (n=1)	Эритромицин	256
		Клиндамицин	>256
	<i>ermB</i> -/ <i>mef</i> - (n=1)	Эритромицин	128
		Клиндамицин	0,94
Все эритромицинорезистентные, n=23	(n=22)	Эритромицин	6–>256
		Клиндамицин	0,047–>256

Примечание. * – пограничные значения МПК эритромицина для чувствительных *S.pyogenes* составляют ≤0,25 мг/л, для клиндамицина – ≤0,5 мг/л (EUCAST, 2015)

Таблица 3. Распределение генов резистентности к макролидам у макролидоустойчивых штаммов *S.pyogenes*

Гены резистентности	Количество штаммов, % штаммов	
	абс.	%
<i>ermB</i> +	15	65,2
<i>mef</i> +	6	26,1
<i>ermB</i> +/ <i>mef</i> +	1	4,3
<i>ermB</i> -/ <i>mef</i> -	1	4,3
Всего	23	100

мов с iMLS_B и cMLS_B фенотипами МПК эритромицина составляла ≥256 мг/л и лишь у 1 изолята она была на уровне 128 мг/л. Для изолятов с М фенотипом также были характерны низкие показатели МПК клиндамицина. Они составляли от 0,047 до 0,125 мг/л, что позволяло отнести их к категории чувствительных. Среди трёх изолятов с iMLS_B фенотипом у двух из них МПК клиндамицина была ≤0,5 мг/л, и они также входили в категорию чувствительных микроорганизмов. Но у одного изолята МПК клиндамицина составляла 0,94 мг/л, т.е. незначительно превышала пороговый уровень 0,5 мг/л. В то же время, по данным исследования диско-диффузионного метода, этот изолят был определен как чувствительный к препарату. У 14 изолятов с cMLS_B фенотипом устойчивости МПК клиндамицина не отличались единообразием, поскольку более чем у половины (7) из них значения МПК находились на сравнительно низких уровнях (от 0,75 до 1,5 мг/л), у остальных 6 штаммов показатели МПК клиндамицина были >256 мг/л.

Следует отметить, что изоляты с М фенотипом были резистентны ко всем исследованным представителям 14- и 15-членных макролидов при сохранении чувствительности к 16-членным макролидам и клиндамицину. Изоляты с iMLS_B (n=3) фенотипом также были резистентны к 14- и 15-членным макролидам, чувствительность к 16-членным макролидам была отмечена у одного из

них. Штаммы *S.pyogenes* с cMLS_B фенотипом были не чувствительны ко всем макролидным антибиотикам и к клиндамицину.

Результаты детекции генов, кодирующих резистентность *S.pyogenes* к макролидным антибиотикам, показали (табл. 3), что только у 6 (26,1%) из 23 изолятов была экспрессия *mef* гена, кодирующего эффлюксный механизм устойчивости. Все штаммы с *mef*-зависимым эффлюксом относились к М фенотипу. У преобладающей части — 15 (65,2%) эритромицинорезистентной популяции *S.pyogenes* был обнаружен *ermB* ген резистентности в качестве одной детерминанты и в одном случае (4,3%) *ermB* ген находился в ассоциации с *mef* геном. У одного изолята гены резистентности не были идентифицированы. Эритромицинорезистентные изоляты с *ermB* геном, а также с комбинацией *mef* — гена имели iMLS_B и cMLS_B фенотипы устойчивости.

Обсуждение результатов

Таким образом, наши результаты изучения уровня резистентности *S.pyogenes* к макролидам и линкозамидам и их генетических детерминант устойчивости, полученные в период 2011–2015 гг., указывают на возросшую резистентность патогена к этим препаратам, особенно отчётливо проявившуюся в 2014–2015 гг. В то же время рост резистентности *S.pyogenes* к макролидам в период 2013–2014 гг. не сопровождался подъё-

мом устойчивости к клиндамицину, и лишь в 2015 году мы видим значимое повышение устойчивости к клиндамицину, которое сопровождалось преобладанием *ermB*-механизма резистентности в популяции.

При рассмотрении уровня резистентности штаммов *S.pyogenes*, выделяемых в России следует отметить, что до 2009 года он был невелик: по данным исследования ПеГас (1999—2003 гг.) выделение нечувствительных штаммов варьировало от 2 до 12% в 1999 г. и от 0,15 до 8% в 2001—2003 гг. При этом низкая частота (2%) устойчивости к 16-членным представителям и более высокий её уровень (до 7—8%) к 14- и 15-членным макролидам косвенно свидетельствовали об эффлюксной природе устойчивости. В следующие периоды (2004—2006 гг.) и (2007—2009 гг.) нечувствительные штаммы *S.pyogenes* составляли 8,7 и 8% [19, 20]. В другой российской работе [21], проведённой в аналогичный период (2004—2007 гг.), получен уровень устойчивости *S.pyogenes* к эритромицину в пределах 12% и выявлена вариабельность этого показателя в зависимости от региона: наибольший уровень устойчивости микроорганизма к макролидам был отмечен в Иркутске, составив 28,2%. В то же время результаты исследования 91 изолята *S.pyogenes*, выделенного в период 2008—2011 гг. в Москве от пациентов со стрептококковой инфекцией мягких тканей, указывают на более высокую резистентность патогена к макролидным антибиотикам, составившую 17,6, 15,4 и 15,4% к азитромицину, кларитромицину и эритромицину и 5,5% — к клиндамицину и 16-членным макролидам [22].

Вариабельность показателей уровня резистентности к макролидам отмечено как в Европе, Америке, так и в азиатских странах, где регистрируется наибольшая частота резистентности. Резистентность к макролидам является управляемым процессом, поскольку во многом связана с частотой их назначения, в первую очередь азитромицина. Выявленная закономерность зависимости между объёмом потребления макролидов в популяции и ростом распространения резистентности стрептококков к макролидам была отмечена ещё в 70—80-е годы прошлого столетия в Финляндии и Японии. В этих странах в результате ограничения потребления препаратов макролидного ряда уровень резистентности к ним резко снизился [23, 24]. В последующие годы в ряде Европейских стран (Франция, Германия) также в результате ограничения использования макролидов и в первую очередь азитромицина отмечена положительная динамика, выразившаяся в снижении уровня резистентности к этим препаратам с 24% (2002—2003 гг.) до 3% (2009—2011 гг.) во Франции и с 13,6% (1999—2000 гг.) до 2,6% (2006—2009 гг.) в Германии [25, 26].

Особенно отчётливо в нашем исследовании проявилась смена детерминант молекулярно-генетического механизма, определяющих устойчивость *S.pyogenes* к макролидам и линкозамидам. Если в исследованиях, относящихся к периоду 2004—2007 гг., ведущим механизмом устойчивости был эффлюкс, опосредованный *mef* геном, и частота MLS_B-фенотипа в Москве составляла лишь 13% [21], то результаты нашей работы свидетельствуют не только о резком возрастании устойчивости *S.pyogenes* к макролидам и линкозамидам в период 2014—2015 гг., но и об изменении спектра детерминант резистентности. В генетическом профиле, определяющем устойчивость *S.pyogenes* к макролидам и линкозамидам, стал преобладать (69,5%) *ermB* ген, кодирующий рибосомальное метилирование, экспрессия которого резко повышает резистентность микроорганизма, распространяясь как на 16-членные макролиды, так и на линкозамиды. Сходное распределение генов резистентности к макролидам наблюдалось и у изолятов *S.pyogenes*, выделенных от детей с фарингитом во Франции, где на долю *ermA* и *ermB* генов также пришлось 69% [25]. Отмечено, что распространённость *ermB* и *mef* генов пиогенного стрептококка имеет выраженные региональные особенности.

Среди причин преимущественного преобладания определённого фенотипа резистентности *S.pyogenes* к макролидам прослеживается связь между селекцией резистентности и структурой потребляемых макролидных антибиотиков [27]. Азитромицин более часто приводил к селекции резистентности, чем кларитромицин. Однако кларитромицин вызывал селекцию более «грозных» штаммов с MLS_B-фенотипом [28]. В то же время отчётливо прослеживается связь между предпочтительной избирательностью применения препарата макролидного ряда в том или ином регионе и распространением различных механизмов резистентности. Отмечено, что в странах Европы, где чаще применяют кларитромицин, резистентность к макролидам по *ermB* гену охватывает 84% изолятов [29], в США при предпочтении лечения азитромицином преимущественно и широко распространён М-фенотип [30, 31].

Таким образом, растущая устойчивость *S.pyogenes* к макролидам может явиться серьёзной проблемой при назначении этиотропного лечения заболеваний, вызванных данным микроорганизмом, у детей с непереносимостью бета-лактамов. Как показали результаты нашей работы, существующий в настоящее время уровень устойчивости *S.pyogenes* к макролидным препаратам ещё позволяет использовать их в качестве эмпирической терапии стрептококковой инфекции. Но учитывая стремительный рост устойчивости, произошедший за сравнительно короткий период наблюдения, требуется постоянный мониторинг

этого процесса. Также получены результаты, свидетельствующие о возросшей устойчивости *S. pyogenes* как к 14- и 15-членным макролидным антибиотикам, так и к 16-членным и линкозамидам, поскольку *ermB* ген стал ведущим механизмом устойчивости *S. pyogenes*. И если раньше назначение 16-членных макролидов было обосновано распространением изолированных *mef* генов, то по данным нашего исследования, такие преимущества у препаратов данной группы перед 14- и 15-членными макролидами снизились, поскольку

ведущим механизмом устойчивости постепенно становится метилирование рибосом. Но даже несмотря на снижение доли клиндаминочувствительных штаммов, при выборе АМП следует учитывать преимущество 16-членных макролидов и выбирать, при невозможности использования амоксициллина или цефалоспоринов, наиболее эффективные макролиды, например джозамицин, к которому по-прежнему чувствительны 26% эритромициноустойчивых штаммов пиогенного стрептококка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маянский А.Н. Стрептококки: микробиология и патология. Вопросы диагностики в педиатрии 2010; 1: 9—19—13. / Majanskij A.N. Streptokokki: mikrobiologija i patologija. Voprosy diagnostiki v pediatrii 2010; 1: 9—19—13. [in Russian]
2. Белов Б.С. А-стрептококковая инфекция глотки в практике интерниста. Вестник оториноларингологии 2013; 3: 39—43. / Belov B.S. A-streptokokkovaja infekcija glotki v praktike internista. Vestnik otorinolaringologii 2013; 3: 39—43. [in Russian]
3. Bidet P., Plainvert C., Doit C., Mariani-Kurkdjian P., Bonacorsi S., Lepoutre A. et al. Infections a *Streptococcus pyogenes* ou streptocoque du groupe A chez l'enfant: donnees du Centre national de reference (CNR). Archives de pediatrie 2010; 17: 201—208.
4. Маянский Н.А., Алябьева Н.М., Иваненко А.М., Пономаренко О.А., Катосова Л.К., Лазарева А.В. и др. Бактериальная этиология острого среднего отита у детей до 5 лет: роль *Streptococcus pneumoniae*. Вопросы диагностики в педиатрии 2013; 5: 3: 5—13. / Majanskij N.A., Aljab'eva N.M., Ivanenko A.M., Ponomarenko O.A., Katosova L.K., Lazareva A.V. i dr. Bakterial'naja jetiologija ostrogo srednego otita u detej do 5 let: rol' *Streptococcus pneumoniae*. Voprosy diagnostiki v pediatrii 2013; 5: 3: 5—13. [in Russian]
5. Катосова Л.К., Очкасов А.В., Богомилский М.Р. Этиология и рациональная терапия тяжелых форм острых средних гнойных отитов у детей. Антибиотики и химиотер 2006; 2: 23—29. / Katosova L.K., Ochkasov A.V., Bogomil'skij M.R. Jetiologija i racional'naja terapija tjazhelyh form ostryh srednih gnojnyh otitov u detej. Antibiotiki i himioter 2006; 2: 23—29. [in Russian]
6. Пономаренко Л.А., Новак В.Л., Калакуцкая А.Н., Лазарева А.В., Крыжановская О.А., Батырова З.К., Катосова Л.К. Частота носительства *Streptococcus pyogenes* и его возрастающая роль в инфекционно-воспалительных процессах у детей. Клинический микробиол. антимикроб. химиотер 2012; 12: 2: Приложение 1: 42. / Ponomarenko L.A., Novak V.L., Kalakuckaja A.N., Lazareva A.V., Kryzhanovskaja O.A., Batyrova Z.K., Katosova L.K. Chastota nositel'stva *Streptococcus pyogenes* i ego vozrastajushhaja rol' v infekcionno-vospalitel'nyh processah u detej. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2012; 12: 2: Prilozhenie 1: 42. [in Russian]
7. Praveen S., Prema A. Prevalence of streptococcal pharyngitis in pediatrics. Int Journal of Pharma and Bio Sciences 2014; 5: 3: 1017—1021.
8. Cohen R., Aujard Y., Bidet P., Bourrillon A., Bingen E., Foucaud P. et al. Le streptocoque du groupe A. Un pathogene majeur pour la prochaine decennie? *Streptococcus pyogenes* an emerging pathogen. Archives de pediatrie 2005; 12: 1065—1067.
9. Kaplan E.L., Chhatwal G.S., Rohde M. Reduced ability of penicillin to eradicate ingested group A streptococci from epithelial cells: clinical and pathogenetic implications. Clin Infect Dis 2006; 43: 11: 1398—1406.
10. Seppala H., Skurnik M., Soini H., Roberts M.C., Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 257—262.
11. Sutcliffe J., Grebe T., Tait-Kamradt A., Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 11: 2562—2566.
12. Bemer-Melchior P., Juvin M.E., Tassin S., Bryskier A., Schito G.C., Drugeon H.-B. In vitro activity of new ketolide telithromycin compared with that of macrolides against *Streptococcus pyogenes*: influences of resistance mechanisms and methodological factors. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 11: 2999—3002.
13. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, version 4, valid from 2014-01-01. 28—32.
14. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2. 1890-04. / Metodicheskie ukazanija po opredeleniju chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. MUK 4.2. 1890-04. [in Russian]
15. Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2012. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative (Tableau XIX).
16. Шпынев К.В., Кречикова О.И., Кречиков В.А., Козлов Р.С. *Streptococcus pyogenes*: характеристика микроорганизма, выделение, идентификация и определение чувствительности к антибактериальным препаратам. Клинический микробиол. антимикроб. химиотер 2007; 9: 2: 104—120. / Shpynev K.V., Krechikova O.I., Krechikov V.A., Kozlov R.S. *Streptococcus pyogenes*: harakteristika mikroorganizma, vydelenie, identifikacija i opredelenie chuvstvitel'nosti k antibakterial'nym preparatam. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2007; 9: 2: 104—120. [in Russian]
17. Reinert R.R., Filimonova O.Y., Al-Lahham A., Grudinina S.A., Ilina E.N., Weigel I.M., Sidorenko S.V. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia. Antimicrob Agents Chemother 2008; 6: 52: 2260—2262.
18. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: 1970; 367. / Plohin'skij N.A. Biometrija. M.: 1970; 367. [in Russian]
19. Козлов Р.С., Сивая О.И., Шпынев К.В., Агапова Е.Д., Розанова С.М., Гузундзе Е.Н. и др. Антибиотикорезистентность *Streptococcus pyogenes* в России: результаты многоцентрового проспективного исследования Пе-ГАС-1. Клинический микробиол. антимикроб. химиотер 2005; 7: 2: 154—166. / Kozlov R.S., Sivaja O.I., Shpynev K.V., Agapova E.D., Rozanova S.M., Gugundze E.N. i dr. Antibiotikorezistentnost' *Streptococcus pyogenes* v Rossii: rezultaty mnogocentrovogo prospektivnogo issledovaniya Pe-GAS-1. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2005; 7: 2: 154—166. [in Russian]
20. Азовская О.В., Иванчик Н.В., Дехнич А.В., Кречикова О.И., Козлов Р.С., исследовательская группа «ПеГАС». Динамика антибиотикорезистентности респираторных штаммов *Streptococcus pyogenes* в России за период 1999—2009 гг. Клинический микробиол. антимикроб. химиотер 2012; 14: 4: 309—321. / Azovskaja O.V., Ivanchik N.V., Dehnic A.V., Krechikova O.I., Kozlov R.S., issledovatel'skaja grupa «PeGAS». Dinamika antibiotikorezistentnosti respiratornyh shtammov *Streptococcus pyogenes* v Rossii za period 1999—2009 gg. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2012; 14: 4: 309—321. [in Russian]
21. Сидоренко С.В., Грудина С.А., Филимонова О.Ю., Столярова Л.Г., Савинова Т.А. Резистентность к макролидам и линкозамидам среди *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* в Российской Федерации. Клиническая фармакол. тер 2008; 17: 2: 1—5. / Sidorenko S.V., Grudinina S.A., Filimonova O.Ju., Stoljarova L.G., Savinova T.A. Rezistentnost' k makrolidam i linkozamidam sredi *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes* v Rossijskoj Federacii. Klinicheskaja farmakol ter 2008; 17: 2: 1—5. [in Russian]
22. Брик Н.И., Дмитриева Н.Ф., Клейменов Д.А., Липатов К.В., Глушкова Е.В., Котин В.В. Чувствительность к антибиотикам стрептококков группы А различных генотипов, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными инфекциями мягких тканей. Клинический микробиол. антимикроб. химиотер 2015; 17: 2: 154—166. / Briko N.I., Dmitrieva N.F., Klejmenov D.A., Lipatov K.V., Glushkova E.V., Kotin V.V. Chuvstvitel'nost' k antibiotikam streptokokkov grupy A razlichnyh genotipov, vydelennyh ot bol'nyh invazivnyimi i neinvazivnyimi infekcijami mjagkih tkanej. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2015; 17: 2: 154—166. [in Russian]
23. Farman D., Henneke P., Hufnagel M., Berner R. Significant decline in the erythromycin resistance of group A streptococcus isolates at a German paediatric tertiary care centre. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 707—710.
24. d'Humieres C., Cohen R., Levy C., Bidet Ph., Thollot F. et al. Decline in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from French children. Int J Med Microbiol 2012; 302: 300—303.
25. Стецюк О.У., Андреева И.В. О селекции устойчивости к макролидам. Клинический микробиол. антимикроб. химиотер 2010; 12: 3: 255—259. / Stecyuk O.U., Andreeva I.V. O selekcii ustojchivosti k makrolidam. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2010; 12: 3: 255—259. [in Russian]

26. Fujita K., Muroso K., Yoshikawa V., Murai T. Decline of erythromycin resistance of group A streptococci in Japan. *Pediatr Infect Dis* 1994; 13: 1075—1078.
27. Seppala H., Nissinen A., Jarvinen H., Huovinen S. *et al.* Resistance to erythromycin in group A streptococci. *New Engl J Med* 1992; 326: 292—297.
28. Malhotra-Kumar S., Lammens Ch., Herck Van K., Goossens H. Effect of azithromycin and clarithromycin in therapy of pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* 2007; 369: February 10: 482—490.
29. Goossens H. Antibiotic consumption and link to resistance. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: Suppl 3: 12—15.
30. Thornsberry C., Brown N.P., Draghi D.C. *et al.* Antimicrobial activity against multidrug-resistant *S.pneumoniae* isolated in United States, 2001—2005. *Postgrad Med* 2008; 120: Suppl 3: 32—38.
31. Guchev I.A., Yu V.L., Sinopalnikov A., Klochkov O.I., Kozlov R.S., Stratchounski L.S. Management of nonsevere pneumonia in military trainees with the urinary antigen test for *Streptococcus pneumoniae*: an innovative approach to targeted therapy. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 11: 1608—1616.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Катосова Любовь Кирилловна — д.б.н., профессор, гл.н.с. лаборатории микробиологии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Лазарева Анна Валерьевна — к.м.н., зав. лабораторией микробиологии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Хохлова Татьяна Александровна — аспирант отделения диагностики и восстановительного лечения ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Пономаренко Ольга Александровна — м.н.с. лаборатории микробиологии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Алябьева Наталья Михайловна — к.м.н., с.н.с. лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Использование растительных экстрактов в создании лекарственных средств разной терапевтической направленности

И. П. СМЕРНОВА¹, О. А. СЕМКИНА^{1,2}, О. В. БОНДАРЕНКО²

¹ Медицинский институт Российского университета дружбы народов, Москва

² Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений, Москва

Plant Extracts in Development of Medicinal Products of Various Therapeutic Value

I. P. SMIRNOVA¹, O. A. SEMKINA^{1,2}, O. V. BONDARENKO²

¹ Medical Institute, Russian Peoples' Friendship University, Moscow

² All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow

В обзоре освещены вопросы разработки, стандартизации и применения лекарственных препаратов растительного происхождения разной терапевтической направленности. Литературные данные касаются работ, проводимых в ряде ведущих институтов Российской Федерации в частности МИ Российского Университета дружбы народов, Всероссийском научно-исследовательском институте лекарственных и ароматических растений, Пятигорской государственной фармацевтической академией, а также работ, проводимых некоторыми зарубежными исследователями. В статье показана возможность и перспективность использования экстракта гриба триходермы.

Ключевые слова: растительный экстракт, технология получения лекарственных препаратов, триходерма.

Development, standardization and use of medicinal products of plant origin and various therapeutic value are described in the review. The literature data refer to the studies of some leading institutions of the Russian Federation and in particular to the Medical Institute of the Russian University of Peoples' Friendship, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy and some foreign laboratories. Possible use of the trichoderma extract and its prospects are shown.

Key words: plant extract, medicinal products development, trichoderma.

Поиск источников биологически активных веществ продолжает оставаться актуальным направлением в фармацевтической промышленности.

Применение лекарственных препаратов растительного происхождения имеет ряд преимуществ по сравнению с синтетическими лекарственными препаратами — это связано с возможностью использования их при хронической форме патологии, не опасаясь побочных явлений, активностью в отношении штаммов микроорганизмов и вирусов, устойчивых к синтетическим и полусинтетическим антибиотикам, а также широким спектром действия фитопрепаратов.

Согласно прогноза Всемирной Организации Здравоохранения, удельный вес фитопрепаратов в ближайшие 15 лет возрастет до 60% от общего объема лекарственных средств. [1] Рассмотрены данные литературы, касающиеся технологии получения и стандартизации лекарственных средств разной терапевтической направленности с ис-

пользованием растительных экстрактов в качестве субстанций. Эти технологии более экономичны, чем создание и разработка лекарственных препаратов на основе синтетических и полусинтетических субстанции и, вследствие этого, имеют большие перспективы как дополнительные средства разного фармакологического эффекта в комплексной терапии ряда заболеваний.

В Сибирском государственном медицинском университете Щетининым П. П., Андреевой В. Ю., Смоляковой И. М., получены гранулы и таблетки на основе экстракта манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L), который оказывает положительное влияние на нормализацию гемореологических свойств крови. Экстракт получали из наземной части манжетки обыкновенной методом многоступенчатого противоточного экстрагирования. Сумму флавоноидов определяли методом дифференциальной спектрофотометрии. Таким образом, была разработана рациональная лекарственная форма, которая обеспечивает стабильность экстрактивного комплекса, выделенного из манжетки обыкновенной. Средство ограничивает формирование повышенной вязкости крови [2].

© Коллектив авторов, 2016

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

Изучено влияние жидкого экстракта травы лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) на цитотоксичность лимфоцитов мышей [3]. Д.А.Бондарь и др. проводили исследования на линейных мышах. В опытах *in vivo* мышам вводили подкожно по 0,5 мл суспензии опухолевых клеток 199 с 40 мкг/мл гентамицина, по 750 тыс кл./мышь. Мышинные лимфоциты выделяли из селезёнки, мишенями служили как аутологичные опухолевые клетки, так и клетки долгосрочных культур. Инкубация в течение 18 часов лимфоцитов мышей с экстрактом в максимально не цитотоксичной концентрации 0,5 мг/кг достоверно увеличивает киллерные свойства лимфоцитов против клеток меланомы В-16,ЕL-4.

Сотрудниками Пятигорской государственной фармацевтической академии Н.В.Постниковой и др. изучено антибактериальное действие гравилата городского (*Geum urbanum* L.) экстракта сухого. Антибактериальное действие определяли методом диффузии в агар, засеянный различными тест-микробами. Испытуемые экстракты помещали в лунки на агаровой поверхности. Для исследований использовали гравилата городского экстракт сухой, его 5% водный раствор и 5% спиртовой раствор (70%). В качестве тест-культур использовали: стафилококки, энтеробактерии и споровые культуры [4].

Для применения в проктологической и урологической практике предложен экстракт из листьев лещины обыкновенной (*Corylus avellana* L.). На его основе разработаны суппозитории. Густой экстракт получали, используя в качестве экстрагента спирт этиловый 40%, стандартизацию проводили в соответствии с фармацевтической статьей (ФС) по показателям: подлинность и содержание действующих веществ (дубильные вещества и флавоноиды), влага, тяжёлые металлы. Полученные результаты не превышали допустимые отклонения основных показателей нормативных документов на данную лекарственную форму [5].

Разработана технология и проведён анализ рациональной лекарственной формы в виде стоматологического спрея, содержащей комплексный экстракт из листьев шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) для профилактики и лечения пародонтитов, гингивитов и других инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта [6].

Х. Н. Гюльбякова и др. [7] разработали технологию и показатели качества стоматологического геля на основе биологически активных веществ березового гриба чага (*Inonotus obliquus*). При получении экстрактов путём экстрагирования под действием электрических разрядов важной задачей являлось определение числа электрических разрядов, при котором извлекается наибольшее количество суммы биологически активных веществ (БАВ). Биологическую доступность (высвобождение

БАВ из геля) определяли методом равновесного диализа, а изучение стабильности и установление сроков годности геля проводили методом «ускоренного старения» при температуре 40°C [7].

Однако растительные экстракты нашли себе применение не только в проктологии, урологии и стоматологии. Многие растительные экстракты обладают противовоспалительным действием и поэтому активно используются в дерматологии, флебологии, для лечения заболеваний верхних дыхательных путей и т.д.

Так, в Пятигорской государственной фармацевтической академии на основе экстракта солодкового корня (*Glycyrrhiza glabra*) и парацетамола разработаны состав и технология получения гранул, обладающих противовоспалительным и жаропонижающим действием. На основе экстракта донника лекарственного (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.) разработан гель противовоспалительного действия. В качестве экстрагента для получения экстракта из травы донника лекарственного использовали спирт этиловый 95%. В процессе исследования было приготовлено и изучено семь образцов геля различного состава (эмульсионная основа, ланолин, вазелин, метилцеллюлоза, флакар, полиэтиленгликоль и карбопол). По результатам биофармацевтической оценки был выбран в качестве основы карбопол [8, 16].

Разработан комплексный препарат для лечения и профилактики флебологических заболеваний, а именно гель с использованием сухих растительных экстрактов, полученных из семян каштана конского обыкновенного и травы арники облиственной. Изучены структурно-механические свойства геля, определены значения pH, вязкость, микробиологическая чистота, установлена подлинность [9].

Для лечения респираторных заболеваний воспалительного характера с кашлевым и астматическими компонентами разработаны состав и технология гранул и таблеток препарата «Глэсол», в котором содержатся экстракты из разных растительных источников. Действующими ингредиентами «Глэсола» являются фитопрепараты: глауцинагидрохлорид из мачка желтого (*Glaucium flavum* Crantz.), эстифан — сухой экстракт из корней эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench) и экстракт солодки сухой из лакричного корня (*Glycyrrhiza glabra* L.) [10].

При разработке технологии получения экстракта из цветков робинии псевдоакация (*Robinia pseudoacacia* L.) и мазей на его основе сотрудниками Пятигорской государственной фармацевтической академии, Н. А. Романцевой и др. [11] были использованы методы реперколяции. Содержание флавоноидов в сырье определяли методом дифференциальной спектрофотометрии. Определение оптимальной концентрации действующих веществ

Примеры растительных экстрактов, обладающих ранозаживляющим действием

Растительный источник	Экстракт	Лекарственная	Фаза раневого	Ссылка
		форма	процесса	
Кора дуба (cortex Quercii)	Густой экстракт	Мазь	Вторая	[13]
Листья астрагала серпоплодного (folia Astragali falcati)	Жидкий экстракт	Мазь	Вторая, третья	[14]
Почки тополя чёрного (gammae Populi nigrae)	Двухфазный экстракт	Мазь	—	[15]
Трава донника лекарственного (herba Meliloti officinalis)	Жидкий экстракт	Гель	—	[16]
Семена верблюжьей колючки (semena Alhagi pseudalhagi)	Жидкий экстракт	Мазь	Вторая, третья	[17]
Плоды рябины обыкновенной (fructus Sorbi aucupariae)	Масляный экстракт	Мазь	—	[18]

в лекарственной форме в виде мази проводилось на крысах с острым венозным застоем в хвосте [11].

Экспериментально обоснован состав и разработана технология получения геля на основе яснотки белой (*Lamium album* L). Экстракт яснотки белой получали циркуляционной экстракцией на установке типа «Сокслет». Для получения геля был выбран синтетический гелеобразователь группы РАП «Carbopol 974-PNF». Нейтрализацию проводили щелочным агентом — триэтаноламин [12].

Большое количество исследований посвящено технологии получения фитопрепаратов ранозаживляющего действия. В таблице представлены примеры лекарственных средств, полученных на основе экстрактов из разных растительных источников.

Предлагаемые лекарственные формы созданы с использованием различных подходов и принципов к технологии получения лекарственных препаратов растительного происхождения, однако имеют сходную терапевтическую направленность. Это весьма важно, так как расширяются возможности лечения заболеваний.

Экстракты микроскопических грибов довольно широко используются как в сельском хозяйстве, так и в медицине, являясь также источником различных биологически активных соединений.

В настоящее время имеется достаточно большое количество сведений, свидетельствующих о биосинтезе биологически активных соединений, антибиотиков и практическом их использовании, получаемых из микроскопического гриба рода *Trichoderma* [19—22]. Из водного экстракта гриба *Trichoderma viride* Perse S. F. Gray японские исследователи выделили фермент, который ингибировал рост лейкемических клеток мыши *in vivo*

и *in vitro*, и идентифицировали его как L-лизин- α -оксидаза (КФ 1.4.3.14) [23].

На кафедре биохимии им. академика Т. Т. Берёзова Медицинского института РУДН был найден активный продуцент L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma harzianum* Rifai F-180, получены положительные результаты его противоопухолевой активности, доказана также антивирусная активность фермента в отношении вируса герпеса простого I-го типа и активность в отношении вируса иммунодефицита человека [24, 25, 27]. Однако технология получения чистого фермента требуют больших затрат, оборудования, реактивов. Нами впервые показано, что термостабильный концентрат культуральной жидкости гриба триходермы, полученный с использованием экономичной технологии, может использоваться в создании гелевой формы с ранозаживляющим действием и послужить дополнительным средством в химиотерапии некоторых патологий [26].

Заключение

Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о возможности использования растительных экстрактов для создания лекарственных средств с разным терапевтическим эффектом. При этом наибольшее количество исследований посвящено созданию лекарственных форм с ранозаживляющим действием. Создание таких лекарственных форм расширяют возможности лечения заболеваний, а на примере экстракта из триходермы показана перспективность использования грибных экстрактов, технологии которых просты, экономичны и, безусловно, заслуживают внимание исследователей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Охотникова В.Ф., Качалина Т.В., Балакина Т.В., Джавахян М.А., Семкина О.А., Качалин Д.С., Климова Е.И., Михеева Н.С., Сокольская Т.А. Современные мягкие лекарственные формы, содержащие фитопрепараты. *Вопр биол мед фарм хим* 2013; 11: 121—126. / Ohotnikova V.F., Kachalina T.V., Balakina T.V., Dzhabahjan M.A., Semkina O.A., Kachalin D.S., Klimova E.I., Miheeva N.S., Sokol'skaja T.A. Sovremennye mjagkie lekarstvennye formy, soderzhashhie fitopreparaty. *Vopr biol med farm him* 2013; 11: 121—126. [in Russian]
2. Щетинин П.П., Андреева В.Ю., Смолякова И.М. Получение гранул и таблеток на основе экстракта манжетки обыкновенной как средства ограничивающего формирование повышенной вязкости крови. *Научные труды 10 международного конгресса «Здоровье и образование в 21 веке» «Инновационные технологии в биологии и меди-*

цине». М.: 2009; 650—651. / Shhetinin P.P., Andreeva V.Ju., Smoljakova I.M. Poluchenie granul i tabletok na osnove jekstrakta manzhetki obyknovennoj kak sredstva ogranichivajushhego formirovanie povyshennoj vjazkosti krovi. *Nauchnye trudy 10 mezhdunarodnogo kongressa «Zdorov'e i obrazovanie v 21 veke» «Innovacionnye tehnologii v biologii i medicine»*. М.: 2009; 650—651. [in Russian]

3. Бондарь Д.А., Бондарь А.А., Барабанов Е.И. Влияние жидкого экстракта травы лядвенца рогатого на цитотоксичность лимфоцитов мышей. Сборник материалов Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». 2007; 14: 803. / Bondar' D.A., Bondar' A.A., Barabanov E.I. Vlijanie zhidkogo jekstrakta travy ljadvenca rogatogo na citotoksichnost' limfocitov myshej. *Sbornik materialov Rossijskogo Nacional'nogo Kongressa «Chelovek i lekarstvo»*. 2007; 14: 803. [in Russian]
4. Постникова Н.В., Вдовенко-Мартынова Н.Н., Степанюк С.Н., Андришина Д. К вопросу о антибактериальном действии гравилата го-

- родского (*Geum urbanum* L.) экстракта сухого. Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». М.: 2005; 489—490. / *Postnikova N.V., Vdovenko-Martynova N.N., Stepanjuk S.N., Andriushina D.* K voprosu o antibakterial'nom dejstvii gravilata gorodskogo (*Geumurbanum* L.) jekstrakta suhogo. Sbornik nauchnyh trudov «Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii». M.: 2005; 489—490. [in Russian]
5. *Тираспольская С.Г. и др.* Разработка технологии и оценка качества суппозиторий на основе густого экстракта из листьев лещины обыкновенной. Научные труды 10 международного конгресса «Здоровье и образование в 21 веке» «Innovacionnyye tehnologii v biologii i medicinine». М.: 2009; 712—714. / *Tiraspol'skaja S.G. i dr.* Razrabotka tehnologii i ocenka kachestva suppozitoriev na osnove gustogo jekstrakta iz list'ev leshhiny obyknovnoy. Nauchnye trudy 10 mezhdunarodnogo kongressa «Zdorov'e i obrazovanie v 21 veke» «Innovacionnyye tehnologii v biologii i medicinine». M.: 2009; 712—714. [in Russian]
 6. *Маркова О.М., Романцова Н.А., Лихота Т.Т., Зыкова Ю.Г.* Разработка технологии и анализа стоматологического спрея на основе экстракта шалфея лекарственного. Научные труды 10 международного конгресса «Здоровье и образование в 21 веке» «Innovacionnyye tehnologii v biologii i medicinine». М.: 2009; 716—718. / *Markova O.M., Romancova N.A., Lihota T.T., Zyкова Ju. G.* Razrabotka tehnologii i analiza stomatologicheskogo spreja na osnove jekstrakta shalfeja lekarstvennogo. Nauchnye trudy 10 mezhdunarodnogo kongressa «Zdorov'e i obrazovanie v 21 veke» «Innovacionnyye tehnologii v biologii i medicinine». M.: 2009; 716—718. [in Russian]
 7. *Гюльбякова Х.Н., Казуб В.Т., Маринина Т.Ф.* Разработка технологии и норм качества стоматологического геля на основе биологически активных веществ чаги. Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» М.: 2005; 306—308. / *Gjul'bjakova H.N., Kazub V.T., Marinina T.F.* Razrabotka tehnologii i norm kachestva stomatologicheskogo gеля na osnove biologicheski aktivnyh veshhestv chagi. Sbornik nauchnyh trudov «Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii» M.: 2005; 306—308. [in Russian]
 8. *Шевченко А.М., Шатило В.В.* Разработка технологии гелеобразующих гранул с экстрактом солодкового корня и парацетамолом. Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». М.: 2005; 252—254. / *Shevchenko A.M., Shatilo V.V.* Razrabotka tehnologii geleobrazujushhih granul s jekstraktom solodkovogo kornja i paracetamolom. Sbornik nauchnyh trudov «Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii». M.: 2005; 252—254. [in Russian]
 9. *Бондаренко О.В., Семкина О.А., Джавахян М.А., Грибкова Е.И.* Разработка состава и технологии геля на основе арники облиственной и каштана конского обыкновенного сухих экстрактов. Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». Пятигорск, 2010; 65: 186—189. / *Bondarenko O.V., Semkina O.A., Dzavahjan M.A., Gribkova E.I.* Razrabotka sostava i tehnologii gеля na osnove arniki oblistvennoj i kashтана konskogo obyknovennogo suhih jekstraktov. Sbornik nauchnyh trudov «Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii», Pjatigorsk, 2010; 65: 186—189. [in Russian]
 10. *Семкина О.А., Джавахян М.А., Охотникова В.Ф., Сокольская Т.А., Мичник О.Ю.* Получение и исследование противокашлевого препарата «ГЛЭСОЛ», предназначенного для применения в педиатрической практике. Сборник научных трудов Всероссийской конференции посвященной 95-летию со дня рождения профессора Алексея Ивановича Шретера «От растения к препарату: традиции и современность 23—24 апреля 2014 г.», М.: 2014; 66—70. / *Semkina O.A., Dzavahjan M.A., Ohotnikova V.F., Sokol'skaja T.A., Michnik O.Ju.* Poluchenie i issledovanie protivokashlevogo preparata «GLJeSOL», prednaznachennogo dlja primeneniya v pediatricheskoj praktike. Sbornik nauchnyh trudov Vserossijskoj konferencii posvjashhennoj 95-letiju so dnja rozhdenija professora Alekseja Ivanovicha Shretera «Ot rasteniya k preparatu: tradicii i sovremennost' 23—24 aprilja 2014 g.», M.: 2014; 66—70. [in Russian]
 11. *Романцова Н.А., Шаталова Т.А., Маркова О.М., Орловская Т.В.* Разработка технологии и анализа экстракта из цветков робинии псевдоакалии и мазей на его основе. Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». М.: 2005; 225—227. / *Romancova N.A., Shatalova T.A., Markova O.M., Orlovskaja T.V.* Razrabotka tehnologii i analiza jekstrakta iz cvetkov robinii psevdoakacii i mazej na ego osnove. Sbornik nauchnyh trudov «Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii». M.: 2005; 225—227. [in Russian]
 12. *Пучкова Е.М., Сименко М.В., Буракова М.А.* Разработка состава и технологии геля на основе яснотки белой. Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». М.: 2005; 223—225. / *Puchkova E.M., Simenko M.V., Burakova M.A.* Razrabotka sostava i tehnologii gеля na osnove jasnotki beloj. Sbornik nauchnyh trudov «Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii». M.: 2005; 223—225. [in Russian]
 13. *Буряк М.В., Хохленкова Н.В.* Изучение осмотической активности новой мази на основе дуба коры экстракта густого. Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». М.: 2005; 172—173. / *Burjak M.V., Hohlenkova N.V.* Izuchenie osmoticheskoj aktivnosti novoj mazi na osnove duba kory jekstrakta gustogo. Sbornik nauchnyh trudov «Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii». M.: 2005; 172—173. [in Russian]
 14. *Гужва Н.Н., Зайцев В.П., Гужва Л.Б., Науменко А.Г.* Разработка гранул с сухим экстрактом астрагала серпоплодного, обладающих адаптогенным действием. Научные труды 10 международного конгресса «Здоровье и образование в 21 веке» «Innovacionnyye tehnologii v biologii i medicinine». М.: 2009; 708—709. / *Guzhva N.N., Zajcev V.P., Guzha L.B., Naumenko A.G.* Razrabotka granul s suhim jekstraktom astragala serpoplodnogo, obladajushhih adaptogennym dejstviem. Nauchnye trudy 10 mezhdunarodnogo kongressa «Zdorov'e i obrazovanie v 21 veke» «Innovacionnyye tehnologii v biologii i medicinine». M.: 2009; 708—709. [in Russian]
 15. *Шилова И.В.* Химический состав и ноотропные свойства экстрактов черники обыкновенной. Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». М.: 2005; 523—524. / *Shilova I.V.* Himicheskij sostav i nootropnye svojstva jekstraktov cherniki obyknovnoy. Sbornik nauchnyh trudov «Razrabotka, issledovanie i marketing novoj farmacevticheskoj produkcii». M.: 2005; 523—524. [in Russian]
 16. *Степанова Э.Ф. и др.* Исследования по разработке геля противовоспалительного действия с экстрактом донника лекарственного. Научные труды 10 международного конгресса «Здоровье и образование в 21 веке» «Innovacionnyye tehnologii v biologii i medicinine». М.: 2009; 714—715. / *Stepanova Je.F. i dr.* Issledovanija po razrabotke gеля protivovospalitel'nogo dejstviya s jekstraktom donnika lekarstvennogo. Nauchnye trudy 10 mezhdunarodnogo kongressa «Zdorov'e i obrazovanie v 21 veke» «Innovacionnyye tehnologii v biologii i medicinine». M.: 2009; 714—715. [in Russian]
 17. *Лохвицкий С.В., Гуляев А.Е., Дарменов Е.Н.* Модифицированная мазь «Алхидин» — эффективное ранозаживляющее средство. Сборник материалов Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». М.: 2007; 14: 843. / *Lohvickij S.V., Guljaev A.E., Darnenov E.N.* Modificirovannaja maz' «Alhidin» — jeffektivnoe ranozazhivljajushhee sredstvo. Sbornik materialov Rossijskogo Nacional'nogo Kongressa «Chelovek i lekarstvo». M.: 2007; 14: 843. [in Russian]
 18. *Волкова А.А., Кулешова С.А.* Изучение актопротекторной активности экстрактов одно- и двухлетних побегов вишни обыкновенной. Сборник материалов Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». М.: 2008; 15: 603. / *Volkova A.A., Kuleshova S.A.* Izuchenie aktoprotektornoj aktivnosti jekstraktov jedno- i dvuletnih pobegov vishni obyknovnoy. Sbornik materialov Rossijskogo Nacional'nogo Kongressa «Chelovek i lekarstvo». M.: 2008; 15: 603. [in Russian]
 19. *Djonovic S., Mendoza-Herrera A., Kenerly C.M.* Functional characterization of β -1,6-glucanase from *Trichoderma virens* and enhanced antifungal activity of transformants constitutively corepressing β -1,6-glucanase and β -1,3-glucanase. 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, Vienna, Austria. 2006a.
 20. *Giese E.C., Covizzi E.G., Fjarsato D., Dekker R.F.H., Silva M.L.C., Barbosa A.M.* Botryospheraen, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphera rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. Process Biochemistry, 2005; 40: 12: 3783—3788.
 21. *Rey M., Delgado-Jarana J., Benítez T.* Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. Appl Microbiol Biotechnol. 2001 May; 55: 5: 604—608.
 22. *Kusakabe H., Kodama K., Kununaka A., Yoshino H., Soda K. Misono H.* A new antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride*. J Bio Chem 1980; 255: 976 981.
 23. *Смирнова И.П., Алексеев С.Б., Шевченко А.А.* Биосинтез противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma* sp. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 5—6: 8—11. / *Smirnova I.P., Alekseev S.B., Shevchenko A.A.* Biosintez protivooпуholevogo fermenta L-lizin- α -oksidazy *Trichoderma* sp. Antibiotiki i himioter 2009; 54: 5—6: 8—11. [in Russian]
 24. *Алексеев С.Б., Селищева А.А., Смирнова И.П., Подборонов В.М., Иванова А.А.* Перспективы терапии онкологических заболеваний L-лизин- α -оксидазой триходеры. Тезисы Международного конгресса по реабилитации в медицине и иммунореабилитации. Дубай, 24—27 апреля 2010 г., 2010; 12: 2: 164—165. / *Alekseev S.B., Selishheva A.A., Smirnova I.P., Podboronov V.M., Ivanova A.A.* Perspektivy terapii onkologicheskikh zabolevanij L-lizin- α -oksidazoy trihodermy. Tezisy Mezhdunarodnogo kongressa po rehabilitacii v medicinine i immunoreabilitacii. Dubaj, 24—27 aprilja 2010 g., 2010; 12: 2: 164—165. [in Russian]
 25. *Подборонов В.М., Кузовников А.Е., Зайцева А.К., Смирнова И.П., Березов Т.Т.* Исследование противоопухолевой субстанции из трихо-

дермы. Антибиотики и химиотер 2011; 56: 9—10: 3—6. / *Podboronov V.M., Kuzovnikov A.E., Zajceva A.K., Smirnova I.P., Berjov T.T.* Issledovanie protivopuholevoj substancii iz trihodermy. Antibiotiki i himioter 2011; 56: 9—10: 3—6. [in Russian]

26. *Сёмкина О.А., Смирнова И.П., Давахян М.А., Бондаренко О.В. Кишмахова Л.М.* Разработка состава и технологии геля ранозаживляющего действия. Вестник РУДН, серия «Медицина» Вестник РУДН, 2013; 4: 79—87. / *Sjomkina O.A., Smirnova I.P., Davahjan M.A., Bondarenko O.V. Kishmahova L.M.* Razrabotka sostava i tehnologii gеля

ranozazhivljajushhego dejstvija. Vestnik RUDN, serija «Medicina» Vestnik RUDN, 2013; 4: 79—87. [in Russian]

27. *Алексеев С.Б., Смирнова И.П.* Влияние L-лизин- α -оксидазы на развитие герпетической генитальной инфекции у морских свинок. Бюлл экспер биол мед 1999; 128: 12: 654—656. / *Alekseev S.B., Smirnova I.P.* Vlijanie L-lizin- α -oksidazy na razvitie gerpeticheskoy genital'noj infekcii u morskikh svinok. Bjull jeksper biol med 1999; 128: 12: 654—656. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Смирнова Ирина Павловна — д.б.н., профессор кафедры биохимии Медицинского факультета Медицинского Института Российского университета дружбы народов, Москва

Семкина Ольга Александровна — к.фарм.н., доцент каф. общей фармацевтической и биомедицинской технологии

Медицинского факультета Медицинского Института Российского университета дружбы народов; ведущий научный сотрудник, отдел фармацевтической технологии, ГНУ ВИЛАР РАСХН, Москва

Бондаренко Ольга Владимировна — провизор, аспирант ГНУ ВИЛАР РАСХН, Москва

Интерферон-гамма: горизонты терапии

А. А. ХРЯНИН^{1,3}, О. В. РЕШЕТНИКОВ²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Новосибирск

² НИИ терапии и профилактической медицины, Новосибирск

³ Ассоциация акушеров-гинекологов и дерматовенерологов, Новосибирск

Interferon-Gamma: Treatment Horizons

A. A. KHRyanIN^{1,3}, O. V. RESHETNIKOV²

¹ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

² Institute of Internal and Preventive Medicine, Novosibirsk

³ Association of Obstetric Gynecologists and Dermatovenerologists, Novosibirsk

В обзоре приводятся современные данные литературы о системе интерферонов, их клетках-продуцентах и клетках-мишенях. Особое внимание уделено иммуномодулирующему действию интерферона- γ . Показана высокая эффективность препарата Ингарон в лечении различных групп заболеваний, прежде всего инфекционных и онкологических.

Ключевые слова: иммуномодуляторы, интерферон- γ , Ингарон, опухоли, вирусные инфекции, иммунитет.

The review provides modern literature data on the system of interferons, their cells producers and target cells. Particular attention is paid to the immunomodulating effect of interferon- γ . High efficacy of Ingaron in the treatment of various groups of diseases, especially viral, infectious and oncologic is shown.

Key words: immunomodulators, interferon- γ , Ingaron, tumors, viral infections, immunity.

В 1957 г. английские вирусологи А. Айзекс и Ж. Линдеман обнаружили, что клетки, заражённые вирусом, вырабатывают особое вещество, угнетающее размножение как гомологичных, так и гетерологичных вирусов, которое они назвали интерфероном.

Интерфероны (ИФН) — общее название, под которым объединяют ряд белков со сходными свойствами, выделяемых клетками организма в ответ на вторжение вируса. Определяемый в качестве ИФН фактор должен быть белковой природы, обладать антивирусной активностью по отношению к разным вирусам (по крайней мере в гомологичных клетках), опосредованной клеточными метаболическими процессами, включающими синтез РНК и белка [1].

Система интерферонов является универсальным фактором как неспецифической резистентности, так и иммунорегуляции; функциональная недостаточность и нарушение синтеза ИФН обуславливает патогенетическую основу большого числа процессов, в том числе воспаление, иммунопатологические реакции и репарацию. Активная выработка ИФН — залог устойчивости

организма к возникновению инфекционных заболеваний или быстрой локализации очага инфекции в случае его возникновения [2].

ИФН относятся к видоспецифическим цитокинам, представляя собой группу биологически активных белков и (или) гликопротеидов, синтезируемых клетками в процессе иммунной реакции в ответ на воздействие стимулирующих агентов. ИФН — важнейшие факторы естественного иммунитета, первая линия противoinфекционной защиты. Особое место ИФН занимают потому, что индукция их синтеза, прежде всего натуральными киллерами, клетками моноцитарного ряда, а также дендритными клетками, предшествует формированию специфических иммунных реакций, как это чётко было показано при ряде вирусных инфекций. Подобно другим цитокинам, специфические защитные эффекты интерфероны реализуют также через каскады проведения сигналов [3].

Интерфероны человека подразделяют на группы в зависимости от типа клеток, в которых они образуются: α , β и γ (таблица).

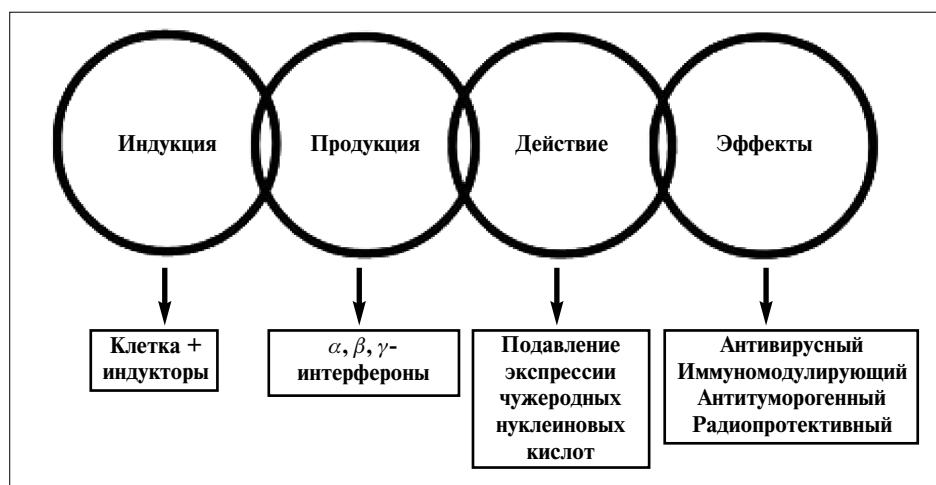
Функционирование системы ИФН складывается из строго следующих друг за другом этапов, представляющих своеобразную цепную реакцию организма в ответ на внедрение чужеродной информации (рисунок).

© А. А. Хрянин, О. В. Решетников, 2016

Адрес для корреспонденции: 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52. Новосибирский ГМУ

Характеристика интерферонов

Наименование	Форма и число аминокислот	Клетки-продуценты	Биологическое действие
ИФН- α	Мономер 166	Лейкоциты	Антивирусное действие, усиление экспрессии молекул I класса МНС
ИФН- β	Мономер 166	Фибробласты	Антивирусное действие, усиление экспрессии молекул I класса МНС
ИФН- γ	Мономер 143	Т-клетки, натуральные киллеры	Активация макрофагов, усиление экспрессии молекул МНС



Функционирование системы интерферонов [4].

Схематично можно выделить четыре основных звена данной цепочки:

- индукция или «включение» системы, приводящей к дерепрессии генов ИФН, транскрипции их информационных РНК с их последующей трансляцией.

- продукция — синтез клетками ИФН- α , - β и - γ и секреция их в окружающую среду.

- действие — защита окружающих клеток от чужеродной информации (вирусы, бактерии и т.д.) вновь образованными ИФН.

- эффекты — описано более 300 эффектов ИФН. К наиболее важным для медицины относятся антивирусные, антимикробные, антипролиферативные (в том числе антитуморогенные) и радиопротективные [4].

В последние годы за рубежом и в нашей стране используется несколько иная классификация. Выделяют три типа эндогенного интерферона (ИФН). ИФН 1-го типа, включающий ИФН- α/β , продуцируемый ядросодержащими клетками, оказывает прямое противовирусное действие на репликацию вирусов в инфицированных клетках, предупреждает инфицирование окружающих и, активируя каскад антивирусных сигнальных путей, включает естественный иммунитет, способствуя развитию адаптивного (приобретённого) иммунного ответа. ИФН 2-го типа — ИФН- γ продуцируется различными субпопуляциями лимфоцитов, регулирует гомеостаз, обеспечивает

функциональную эффективность специфического адаптивного (приобретённого) иммунитета. Недавно открытый 3-й тип — ИФН- λ функционально тесно связан с ИФН 1-го типа [5].

В защите организма от инфекций участвуют интерфероны ИФН 1-го типа (ИФН- α), которые, как показали многочисленные исследования, обладают противовирусной и иммуномодулирующей активностью. Их противовирусная актив-

ность связана с экспрессией генов 2'-5'-олигонуклеотидсинтетазы, сАМР-зависимой протеинкиназы, Мх-белка и др. Белковые продукты этих генов определяют клеточную резистентность макроорганизма, ингибируя репликацию вируса и препятствуя его диссеминации. ИФН- α оказывают также выраженное иммунорегуляторное действие, модулируя продукцию антител. Кроме того, ИФН- α повышают клеточную цитотоксичность Т-лимфоцитов и естественных киллеров, ингибируя их пролиферативную активность. ИФН- α способствуют преимущественной дифференцировке Т-хелперов в Th1-лимфоциты. Дендритные клетки (ДК) при вирусных и бактериальных инфекциях, так же как и плазмоцитоидные моноциты, продуцируют ИФН- α . Следовательно, противовирусная и антибактериальная защита зависит не только от активности макрофагального звена иммунитета, но и от активности ДК. Защита макрофагов и дендритных клеток от вирусов предотвращает развитие фатального синдрома системного воспалительного ответа, характеризующегося высвобождением провоспалительных цитокинов: интерлейкина (ИЛ)-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ИФН- γ , ФНО- α . Цитокины регулируют не только продукцию ИФН- α/β , но и индуцируют «противовирусное состояние», которое характеризуется как подавлением вирусной репликации, так и усилением способности клеток лизировать инфицированные вирусом клетки [6, 7].

Если ИФН 1-го типа принимают непосредственное участие в защите от вирусов, то ИФН 2-го типа (ИФН- γ) в иммунной системе занимает более высокое иерархическое положение, влияя на процессы специфического и неспецифического клеточного иммунитета. ИФН- γ справедливо называют «иммунным интерфероном». Под влиянием ИФН- γ Т-лимфоциты с хелперной направленностью приобретают способность синтезировать, кроме ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-12 и ряд других цитокинов, потенцирующих клеточный иммунитет (Th1-иммунный ответ). Активированный рецептор ИФН- γ взаимодействует с транскрипционным регуляторным фактором STAT-1 и двумя типами протеинкиназ, которые и фосфорилируют STAT-1, приводя его к димеризации, в такой форме он способен транспортироваться в клеточное ядро и связываться с регуляторными последовательностями генов, вовлечённых в клеточный ответ на данный стимул. Результатом активации этих генов является формирование клеточной защиты от вирусной инфекции, включением синтеза ИЛ-12, важнейшего партнёра ИФН- γ в противостоянии вирусным инфекциям [6, 7].

Основные направления применения интерферона- γ :

1. Лечение хронического вирусного гепатита С, хронического вирусного гепатита В, ВИЧ/СПИД инфекции и туберкулёза лёгких в комплексной терапии.
2. Профилактика инфекционных осложнений у больных с хронической гранулематозной болезнью.
3. Лечение онкологических заболеваний в комплексной терапии в качестве иммуномодулятора, в том числе в комбинации с химиотерапией.
4. Лечение генитальной герпесвирусной инфекции и опоясывающего лишая (*herpes zoster*) в монотерапии.
5. Лечение урогенитального хламидиоза в комплексной терапии.
6. Лечение гриппа в комплексе с интерфероном- α .

Не останавливаясь подробно на всех аспектах терапии ИФН- γ , отметим лишь последние важные факты. Хотя результаты монотерапии ИФН- γ вирусных гепатитов В и С оказались недостаточно эффективными, этот препарат может иметь дополнительные преимущества. Недавнее исследование, проведённое Y.J.Wu и соавт. показало, что у HBsAg позитивных пациентов со II—IV стадией фиброза печени после 9 месяцев лечения ИФН- γ степень фиброза значительно уменьшилась в течение 4—6 лет наблюдения [8].

ИФН- γ был использован с положительным результатом в лечении связанных с ВИЧ оппортунистических инфекций в сочетании или без высо-

коактивной антиретровирусной терапии для восстановления иммунного ответа у ВИЧ-инфицированных пациентов [9]. Показаны предварительные обнадеживающие результаты лечения ИФН- γ аспергиллёза и криптококкового менингита [7].

Применение нового отечественного препарата ИФН- γ (Ингарон) открыло новые возможности профилактики и терапии гриппа и других ОРВИ. В результате испытаний, проведённых в НИИ гриппа, было показано, что ИФН- γ проявляет выраженную противовирусную активность в отношении различных штаммов вируса гриппа (в том числе и вирусов гриппа птиц и свиней). Учитывая тот факт, что вирусы гриппа могут подавлять продукцию ИФН 1-го типа, применение ИФН 2-го типа для профилактики и лечения гриппа человека является целесообразным. Была показана перспективность комбинированного использования двух основных классов ИФН (α и γ) для лечения гриппа. Клинические исследования показали, что комплексное применение этих препаратов ИФН при гриппе приводит к ослаблению тяжести течения инфекционного процесса, укорочению времени заболевания и предотвращает развитие тяжёлых осложнений [2].

Отличительной особенностью рекомбинантных интерферонов является то, что они получены вне организма человека (продуцируются бактерией *Escherichia coli*, в ДНК которой встроены гены человеческого интерферона). Это значительно удешевляет производство и сводит к нулю вероятность передачи какой-либо инфекции от донора.

В настоящее время препараты на основе ИФН- γ производятся всего в трёх странах: в США, Германии и России.

Отечественный инновационный препарат на основе рекомбинантного человеческого ИФН- γ зарегистрирован под торговым названием Ингарон. Главным преимуществом рекомбинантных интерферонов, в отличие от лейкоцитарных, в которых используется донорская кровь, является высокая безопасность в отношении возможности передачи вирусов человека при их использовании. На данный момент Ингарон является единственным препаратом на основе ИФН- γ в РФ и выпускается в двух лекарственных формах: интраназальной и инъекционной. Для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ применяется интраназальная форма в виде лиофилизата (порошка), после разведения которого водой для инъекций получают капли в нос. Таким образом, противовирусный барьер создаётся непосредственно в месте внедрения инфекции — носоглотке и действие препарата начинается сразу после всасывания в слизистую носа, что позволяет максимально ускорить эффект от его применения. Отсутствие побочных явлений способствует применению препарата у людей пожилого возрас-

та, а также людям с хроническими заболеваниями. Ингарон не вызывает лекарственного привыкания и может использоваться в качестве семейного препарата, за исключением беременных и детей в возрасте до 7 лет, поскольку на этих группах населения клинические испытания не проводились.

Ингарон — рекомбинантный ИФН- γ человека состоит из 144 аминокислотных остатков, лишён первых трёх из них — Cys-Tyr-Cys, заменённых на Met. Молекулярная масса 16,9 кДа. Получен микробиологическим синтезом в рекомбинантном штамме *Escherichia coli* и очищен колоночной хроматографией. Удельная противовирусная активность на клетках (фибробласты человека), инфицированных вирусом герпетического стоматита, составляет 2×10^7 ЕД на 1 мг белка. ИФН- γ (иммунный интерферон) является важнейшим провоспалительным цитокином, продуцентами которого в организме человека являются естественные киллерные клетки, CD4 Th1 клетки и CD8 цитотоксические супрессорные клетки. Рецепторы к интерферону- γ имеют макрофаги, нейтрофилы, естественные киллерные клетки, цитотоксические Т-лимфоциты. ИФН- γ активирует эффекторные функции этих клеток, в частности их микробоцидность, цитотоксичность, продукцию цитокинов, супероксидных и нитрооксидных радикалов, тем самым вызывая гибель внутриклеточных паразитов. ИФН- γ ингибирует В-клеточный ответ, ИЛ-4, подавляет продукцию IgE и экспрессию CD23-антигена. Он является индуктором апоптоза дифференцированных В-клеток, дающих начало аутореактивным клонам. Отменяет супрессивный эффект ИЛ-4 на ИЛ-2-зависимую пролиферацию и генерацию лимфокин-активированных киллеров. Активирует продукцию белков острой фазы воспаления, усиливает экспрессию генов C₂- и C₄-компонентов системы комплемента. В отличие от других интерферонов повышает экспрессию антигенов ГКГС как 1-го, так и 2-го типов на разных клетках, причём индуцирует экспрессию этих молекул даже на тех клетках, которые не экспрессируют их конститутивно. Тем самым повышается эффективность презентации антигенов и способность их распознавания Т-лимфоцитами. ИФН- γ блокирует репликацию вирусных ДНК и РНК, синтез вирусных белков и сборку зрелых вирусных частиц. ИФН- γ оказывает цитотоксическое воздействие на вирус-инфицированные клетки. ИФН- γ блокирует синтез β -TGF, ответственного за развитие фиброза лёгких и печени.

25-летний опыт использования иммуномодуляторов в онкологии выявил ряд положительных сторон этого вида лечения. Показано, что некоторые препараты способствуют быстрому восстановлению иммунологических и гематологических показателей после хирургической, химио- и

радиотерапии, что позволяет раньше начинать следующие курсы лечения, а это, в свою очередь, повышает эффективность проводимой терапии.

ИФН- γ повышает экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости МНС I и II классов на поверхности опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, наличие которых на опухолевых клетках необходимо для развития специфического противоопухолевого иммунного ответа. ИФН- γ оказывает также прямое антипролиферативное действие на опухолевые клетки и индуцирует их апоптоз *in vitro* и *in vivo*. Противоопухолевое действие ИФН- γ связано также с его способностью активировать НК-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты и макрофаги. По-видимому, противоопухолевое действие ИФН- γ обусловлено комбинацией его иммуномодулирующей активности, прямого антипролиферативного действия на опухолевые клетки и подавления ангиогенеза [10].

В лаборатории клинической иммунологии опухолей НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН проведено изучение влияния терапии Ингароном в сочетании с химиотерапией на основные показатели иммунологической реактивности организма: субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и цитотоксическую активность естественных киллеров (НК-клеток) больных меланомой, раком молочной железы и раком шейки матки на разных этапах лечения. Наиболее интересным оказалось влияние Ингарона на естественные киллеры. Независимо от количества этих клеток Ингарон увеличивал их цитотоксические потенции относительно опухолевых клеток [10].

С этим солидарны и другие авторы. На сегодняшний день наилучшие результаты при лечении онкологических заболеваний дает комбинирование традиционных методов лечения с цитокинотерапией, которая снижает негативное влияние химиотерапии на иммунитет, уменьшает токсичность некоторых противоопухолевых препаратов. При химиотерапии большое значение имеет способность цитокинов снижать токсичность препаратов и укреплять иммунитет. Кроме того, при комбинированном лечении цитокины помогают преодолевать резистентность опухолевых клеток к химиотерапии, существенно повышая эффективность лечения. Таким образом, цитокинотерапия позволяет более успешно лечить разные онкологические заболевания даже на поздних стадиях [11, 12].

Получены успешные результаты включения Ингарона в терапию инфекций, передающихся половым путём (ИППП). Недавнее исследование включило 45 пациентов в возрасте от 20 до 48 лет, из них — 15 пациентов с диагнозом «Аногенитальная герпетическая инфекция» (1А и 1В под-

группы) и 30 пациентов с диагнозом «Аногенитальные (венерические) бородавки» (2А и 2В подгруппы). Диагнозы были подтверждены методом полимеразной цепной реакции. Пациентам 1А подгруппы проводилась терапия препаратом Ингарон, пациентам 1В подгруппы — препаратом Ацикловир; пациентам 2А подгруппы проводилась терапия препаратом Ингарон в комбинации с криодеструкцией; пациентам 2В подгруппы — криодеструкция аногенитальных бородавок. Наблюдение за пациентами с целью оценки эффективности и безопасности терапии продолжалось в течение 100—200 дней, получены следующие результаты. Отсутствие рецидивов аногенитальной герпетической инфекции у больных, проходивших терапию препаратом Ингарон, зарегистрировано в 85,7% наблюдений, препаратом Ацикловир — в 87,5% наблюдений. У больных с аногенитальными бородавками эффективность комбинированной терапии (Ингарон + криодеструкция) достоверно превышала таковую при использовании только криодеструкции: в 93,3% и 53,3% наблюдений соответственно. Серьёзных нежелательных явлений терапии, а также клинически значимых изменений в общеклиническом и биохимическом анализах крови на фоне проводимой терапии не зарегистрировано. Автор [13] заключает, что Ингарон обладает высоким профилем клинической эффективности и безопасности и может быть рекомендован в терапии вирусных инфекций, передаваемых половым путём, особенно у больных с рецидивирующим течением заболеваний. Подобный положительный эффект

Ингарона ранее был отмечен в терапии опоясывающего лишая, вызванного другим видом вируса герпеса [14].

В проспективном открытом контролируемом исследовании эффективности и безопасности Ингарона у 30 больных хроническим простатитом противорецидивный эффект препарата сохранялся в течение 6 месяцев после окончания курса лечения у 66,7% больных против 20% у пациентов контрольной группы. Делается вывод, что Ингарон при курсовом лечении в рекомендуемой дозировке является безопасным препаратом с хорошей переносимостью и может быть рекомендован для комплексной терапии больных хроническим простатитом [15].

Описано успешное излечение персистирующего уретропростатита при выявленной ассоциации возбудителей ИППП, представленной *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*. Положительная динамика важнейших иммунологических параметров (уровень секреторных IgA-АТ в семенной плазме, титр противохламидийных IgG-АТ) отмечалась после комплексного лечения с включением Ингарона [16].

В заключение следует отметить, что интерфероны, в частности интерферон-γ (Ингарон) обладают выраженным действием и должны применяться в виде комплексной или монотерапии при широком спектре заболеваний, прежде всего инфекционных и онкологических. Препарат зарекомендовал себя как весьма эффективный иммуномодулятор с хорошей переносимостью пациентами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stewart W.E. In: The interferon system. Springer-Verlag. Wein New-York; 1979; 421.
2. Еришов Ф.И. Применение интерферонов 1-го и 2-го типов при вирусных инфекциях. Вopr вирусол 2013; S1: 145—154. / Ershov F.I. Primenenie interferonov 1-go i 2-go tipov pri virusnyh infekcijah. Vopr virusol 2013; S1: 145—154. [In Russian]
3. Иммунокорригирующая терапия инфекционно-воспалительных заболеваний женской половой сферы. / Айламазян Э.К., Павлов И.П. ред. СПб.: Тактик-Студио; 2007: 56. / Immunokorrigirujushhaja terapija infekcionno-vozpалitel'nyh zabolevanij zhenskoi polovoi sfery. / Ajlamazjan Je.K., Pavlov I.P. eds. SPb.: Taktik-Studio; 2007: 56. [In Russian]
4. Еришов Ф.И. Открытие биологического феномена и его последующее научное познание. Вopr вирусол 2012; 4: 4—8. / Ershov F.I. Otkrytie biologicheskogo fenomena i ego posledujushhee nauchnoe poznanie. Vopr virusol 2012; 4: 4—8. [In Russian]
5. Романцов М.Г. Механизм действия и особенности фармакокинетики циклоферона. Инфекц болезни 2015; Спецвыпуск 1: 14—15. / Romancov M.G. Mehanizm dejstvija i osobennosti farmakokinetiki cikloferona. Infekc bolezni 2015; Specvypusk 1: 14—15. [In Russian]
6. Романцов М.Г., Кремень Н.В., Наровлянский А.Н. и соавт. Терапия хронического гепатита С с учётом иммунопатогенетических механизмов. Фунд исследования 2008; 9: 30—37. / Romancov M.G., Kremen' N.V., Narovljanskij A.N. i soavt. Terapija hronicheskogo gepatita S s uchetom immunopatogeneticheskikh mehanizmov. Fund issledovaniya 2008; 9: 30—37. [In Russian]
7. Smith N.L.D., Denning D.W. Clinical implications of interferon-γ genetic and epigenetic variants. Immunology 2014; 143: 499—511.
8. Wu Y.J., Cai W.M., Li Q. et al. Long-term antifibrotic action of interferon-gamma treatment in patients with chronic hepatitis B virus infection. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2011; 10: 151—157.
9. Lin F.C., Young H.A. Interferons: success in anti-viral immunotherapy. Cytokine Growth Factor Rev. 2014; 25: 4: 369—376.
10. Кадагидзе З.Г., Славина Е.Г., Черткова А.Н. Интерферон-гамма в онкологии. Фарматека 2013; 17 (270): 40—45. / Kadagidze Z.G., Slavina E.G., Chertkova A.N. Interferon-gamma v onkologii. Farmateka 2013; 17 (270): 40—45. [In Russian]
11. Брюзгин В.В., Платинский Л.В. Роль цитокинов в химиотерапии злокачественных опухолей: практика применения цитокиновых препаратов Рефнот® и Ингарон® при распространенных опухолевых процессах с множественными метастазами. Соврем онкол 2014; 1: 70—75. / Brjuzgin V.V., Platinskij L.V. Rol' citokinov v himioterapii zlokachestvennyh opuholej: praktika primenenija citokinovyh preparatov Refnot® i Ingaron® pri rasprostranennyh opuholevyh processah s mnozhestvennymi metastazami. Sovrem onkol 2014; 1: 70—75. [In Russian]
12. Неродо Г.А., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Арджа А.Ю. Применение Ингарона в комплексе с химиотерапией у больных раком яичников III—IV стадий. Фунд исследования 2015; 1—8: 1649—1654. / Nerodo G.A., Novikova I.A., Zlatnik E.Ju., Ardza A.Ju. Primenenie Ingarona v komplekse s himioterapijeju u bol'nyh rakom jaichnikov III—IV stadij. Fund issledovaniya 2015; 1—8: 1649—1654. [In Russian]
13. Рахматулина М.Р. Современные возможности терапии вирусных инфекций, передаваемых половым путём. Акуш и гин 2015; 7: 100—105. / Rahmatulina M.R. Sovremennye vozmozhnosti terapii virusnyh infekcij, peredavaemyh polovym putem. Akush i gin 2015; 7: 100—105. [In Russian]
14. Малеев В.В., Шмелев В.А., Гиндис А.А., Рахматулина М.Р. Современные подходы к терапии опоясывающего лишая. Инфекц болезни 2007; 3: 28—31. / Maleev V.V., Shmelev V.A., Gindis A.A., Rahmatulina M.R. Sovremennye podhody k terapii opoyasyvajushhego lishaja. Infekc bolezni 2007; 3: 28—31. [In Russian]
15. Пушкарь Д.Ю., Касян Г.Р. Новое в лечении хронического простатита: интерферон-гамма. Фарматека 2012; 4: 65—67. / Pushkar' D.Ju., Kasjan G.R. Novoe v lechenii hronicheskogo prostatita: interferon-gamma. Farmateka 2012; 4: 65—67. [In Russian]

16. Молочков В.А., Скирда Т.А., Алешкин В.А. К вопросу о лечении персистирующего урогенитального хламидиоза. Росс журн кожн и венерич болезней 2013; 4: 55—60. / *Molochkov V.A., Skirda T.A.,*

Aleshkin V.A. K voprosu o lechenii persistirujushhego urogenital'nogo hlamidioza. Ross zhurn kozhn i venerich boleznej 2013; 4: 55—60. [In Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хрянин Алексей Алексеевич — д. м. н., профессор ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России», Новосибирск. SPIN-код автора в РИНЦ: 4311-2475

Решетников Олег Вадимович — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины», Новосибирск. SPIN-код автора в РИНЦ: 6837-8271

Новые данные о молекулярных мишенях тамоксифена, отличных от рецепторов эстрогенов, и их клиническая значимость

Т. А. БОГУШ¹, Б. Б. ПОЛЕЖАЕВ², Е. А. ДУДКО¹, Е. А. БОГУШ¹, В. Ю. КИРСАНОВ¹,
Б. Е. ПОЛОЦКИЙ¹, С. А. ТЮЛЯНДИН¹, М. И. ДАВЫДОВ¹

¹ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина Минздрава России, Москва

² Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва

New Data on Molecular Targets of Tamoxifen Besides Estrogen Receptors, Their Clinical Significancy

T. A. BOGUSH¹, B. B. POLEZHAEV², E. A. DUDKO¹, E. A. BOGUSH¹,
V. YU. KIRSANOV¹, B. E. POLOTSKY¹, S. A. TJULJANDIN¹, M. I. DAVYDOV¹

¹ N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

² Faculty of Fundamental Medicine, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Тамоксифен — первый таргетный препарат, который по-прежнему занимает лидирующую позицию в лечении рака молочной железы. Экспериментальные работы последних лет раскрывают всё новые и новые биологические эффекты при воздействии тамоксифена на опухолевые клетки. Данная публикация является продолжением опубликованного в 2012 г. обзора данных литературы, демонстрирующих многообразие эффектов тамоксифена, не связанных с его взаимодействием с рецепторами эстрогенов. Так, выявлен обширный спектр мишеней препарата, которые являются ключевыми точками сигнальных каскадов, активирующих пролиферацию клеток, определяют агрессивность течения опухолевого процесса и чувствительность к химиотерапии. Описаны клинические исследования применения тамоксифена, основанием для которых явилось воздействие препарата на мишени, отличные от рецепторов эстрогенов. Кроме того, в обзор включены данные о противовирусной, противобактериальной, противогрибковой и противопаразитарной активности тамоксифена.

Ключевые слова: тамоксифен, протеинкиназа C, апоптоз, антиангиогенное действие, метастазирование, лекарственная устойчивость, противоопухолевое действие.

Tamoxifen is the first target agent with a high-end position in breast cancer therapy till now. In recent years experimental researches revealed new biological effects of tamoxifen on tumor cells. The present study continues the theme of the review published in 2012, where a plenty of tamoxifen effects besides interaction with estrogen receptors was discussed. Thus, there is described a wide range of the drug targets which are the key points of signal cascades activating the cell proliferation and determining the course of the growth of the cancer and its sensitivity to chemotherapy. Also clinical trials of tamoxifen based on existing of targets besides the estrogen receptors are reviewed. Furthermore, the data on the antiviral, antibacterial, antifungal and antiparasitic activities of tamoxifen are indicated.

Key words: tamoxifen, protein kinase C, apoptosis, antiangiogenic action, metastasis, drug resistance, anticancer action.

Введение

Несмотря на развитие гормональной противоопухолевой терапии и связанное с этим появление новых лекарств, тамоксифен является одним из наиболее ярких и неизменно эффективных «долгожителей» среди лекарственных препаратов, которые используются при лечении злокачественных новообразований. Это — первый таргетный препарат, который по-прежнему занимает лидирующую позицию в лечении рака молочной железы, и многолетний золотой стандарт в адъювантном лечении рака молочной железы с положительным статусом рецепторов эстрогенов.

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: E-mail: bogush@orc.ru

Экспериментальные работы последних лет раскрывают всё новые и новые биологические эффекты воздействия тамоксифена на опухолевые клетки. Выявлен обширный спектр мишеней препарата, отличных от рецепторов эстрогенов, которые являются ключевыми точками сигнальных каскадов, активирующих пролиферацию клеток, определяют агрессивность течения опухолевого процесса и чувствительность к химиотерапии.

Появляется всё больше и больше доказательств того, что антиэстрогенный эффект препарата является лишь «верхушкой айсберга», и механизм воздействия тамоксифена гораздо шире. В совокупности эти данные позволяют по-новому взглянуть на эффективность препарата при лечении рака молочной железы, а также стимулируют поиск новых показаний к его назначению для

лекарственной терапии опухолей других локализаций, в том числе и в комбинации с современными таргетными препаратами. Более того, появились интересные данные об эффективности тамоксифена и в случае неонкологических заболеваний, и не только у человека.

В обзоре 2012 г. мы обобщили известные на тот момент данные относительно эффектов тамоксифена, не связанных с его взаимодействием с рецепторами эстрогенов [1]. Задача настоящей публикации состоит в оценке того, насколько этот аспект действия антиэстрогена продолжает вызывать интерес исследователей и насколько пополнились и расширились знания в рамках этого вопроса. Кроме того, в обзор включены ранее не обсуждавшиеся данные о противовирусной, противобактериальной, противогрибковой и противопаразитарной активности тамоксифена, а также сообщения об эффективности применения антиэстрогена у онкологических больных.

1. Тамоксифен как ингибитор протеинкиназы C (PKC): экспериментальные факты и клинические наблюдения

Обширные сведения об ингибирующем воздействии тамоксифена на PKC в последние годы существенно пополнились новыми данными.

В культуре клеток глиобластомы при воздействии тамоксифена продемонстрировано усиление цитотоксичности противоопухолевого препарата темозоламида, при этом отмечены остановка клеточного цикла преимущественно в фазах S, G2 и M, увеличение количества апоптозов и снижение уровня фосфорилированной PKC разных типов [2]. В другом исследовании также на культуре клеток глиомы выявлен радиосенсибилизирующий эффект тамоксифена, при воздействии которого отмечено замедление репарации повреждений ДНК, вызванных облучением, остановка клеточного цикла в фазах G2/M и увеличение количества апоптозов. Эти эффекты были связаны с ингибированием PKC- ι — атипичного варианта PKC, гиперэкспрессия которой обнаружена в глиобластоме и других злокачественных опухолях. Установлено, что PKC- ι активирует циклин-зависимую киназу Cdk7 и проапоптотический белок Bad, способствуя опухолевому росту [3].

В свете этих и рассмотренных ранее многочисленных данных об ингибировании тамоксифеном разных типов PKC, которая играет одну из ключевых ролей в патогенезе злокачественных новообразований головного мозга [4], интересны некоторые клинические работы. В частности, в исследовании с привлечением 32 пациентов с рецидивом анапластической астроцитомы и мульт

тиформной глиомы средняя продолжительность жизни от начала терапии тамоксифеном составила 16,0 и 7,2 мес. соответственно. Более трети больных пережили 3,5 года, из них 2 пациента прожили более 4 лет [4]. В исследовании, включавшем 24 больных с рецидивом анапластической астроцитомы, при монотерапии тамоксифеном средняя продолжительность жизни достигла 17,5 мес.; 1 год пережили 9 больных, а 2 года — 5 пациентов [5].

При применении тамоксифена в комбинации с карбоплатином и радиотерапией у 40 больных с низкодифференцированной глиомой продолжительность безрецидивного периода составила 10 мес., а в группе без тамоксифена — только 4 мес. Соответственно годовая выживаемость составила 62 и 30%, а двухгодичная — 40% в группе с тамоксифеном. В группе, не получавшей тамоксифен, 2 года не пережил ни один больной [6]. При лечении карбоплатином в комбинации с тамоксифеном 27 больных с рецидивом смешанной, мультитформной глиомы или злокачественной астроцитомы медиана продолжительности жизни составила 14 мес., а два пациента прожили почти по 7 лет [7]. При терапии темозоламидом в комбинации с тамоксифеном 32 пациентов с рецидивом глиобластомы средняя продолжительность жизни составила 17,5 мес. [8].

Возвращаясь к фундаментальным исследованиям, показано, что метаболит тамоксифена 4-дегидрокситамоксифен вызывает PKC-опосредованную индукцию аутофагии в культуре клеток шванномы, глиомы, колоректального рака, рака поджелудочной и молочной железы. Ингибирование PKC приводило к деградации рецептора эпидермального фактора роста EGFR и ГТФазы KRas с последующим подавлением активности белков MAP-киназного сигнального каскада JNK и Erk1/2 и как результат — к накоплению в клетках аутофаголизосом и активации аутофагии [9].

В культуре клеток рака поджелудочной железы исследовано взаимодействие тамоксифена с кантаридином — противоопухолевым препаратом растительного происхождения, ингибирующим протеинфосфатазу 2A (PP2A). Участие этого фермента в процессе канцерогенеза активно изучается. В частности, ингибирование PP2A при воздействии кантаридина приводит к подавлению опухолевого роста, однако активация PKC и других белков при этом индуцирует лекарственную резистентность. При воздействии тамоксифена, в том числе и в комбинации с кантаридином, показано снижение концентрации в клетках фосфорилированной PKC α , что указывает на перспективность этой комбинации для противоопухолевой терапии [10].

В этой связи интересны клинические данные об эффективности тамоксифена при терапии ра-

ка поджелудочной железы. В частности, в работе J.J. Keating et al с привлечением 108 пациентов с неоперабельной или метастатической стадией заболевания описано увеличение продолжительности жизни в группе, получавшей тамоксифен, до 5,2 против 3,0 мес. в группе без лечения [11].

Выраженный противоопухолевый эффект тамоксифена у пациентов с неоперабельным раком поджелудочной железы описан и в других работах. Так, продолжительность жизни при применении тамоксифена в сравнении с группой без лечения составила 8,5 vs 2,5 мес. [12], 7 vs 3 мес. [13] и 7,8 vs 4,3 мес. [14]. Более того, в литературе описан клинический случай полного регресса очага в поджелудочной железе и метастаза в печени с последующим отсутствием прогрессирования в течение 50 мес. на фоне монотерапии тамоксифеном [15].

Повышение эффективности терапии описано и при комбинации тамоксифена с октреотидом — аналогом соматостатина, который широко используется в терапии рака поджелудочной железы: продолжительность жизни увеличилась в сравнении с историческим контролем до 7 vs. 3,5 мес [16] и до 12 vs. 3 мес [17].

Поскольку РКС участвует не только в канцерогенезе, но и в реализации других патологических процессов, интересны исследования эффективности тамоксифена при лечении неонкологических заболеваний.

Например, в экспериментах на мышах изучено влияние тамоксифена на развитие гипертрофической кардиомиопатии [18]. В клетках миокарда РКС ответственна за развитие гипертрофии и фиброза, а также за угнетение активности Na⁺, K⁺-АТФазы, что приводит к сердечной недостаточности. Использование тамоксифена у мышей с индуцированной гипертрофией миокарда приводило к уменьшению сердечной недостаточности и улучшению гемодинамических показателей, к повышению активности Na⁺, K⁺-АТФаз и снижению уровня лактатдегидрогеназы, которая является маркёром повреждения миокарда.

Другим интересным эффектом тамоксифена, реализующимся с участием РКС, является антиманиакальное действие препарата. В нервной ткани РКС отвечает за многие процессы: за возбудимость нейронов, экспрессию различных генов, высвобождение нейромедиаторов, работу ионных каналов и т.д. В экспериментах *in vitro* показано, что тамоксифен, ингибируя РКС, снижает высвобождение глутамата в возбуждённых нервных окончаниях [19]. При этом в опытах на животных с индуцированными маниакальными состояниями тамоксифен продемонстрировал антиманиакальное действие, сходное с действием других ингибиторов РКС [20]. В клиническом плацебо-контролируемом исследовании с привлечением 66

пациентов с маниакальной стадией биполярного аффективного расстройства антиманиакальный эффект тамоксифена был подтвержден [21].

Ещё одной перспективой применения тамоксифена, реализуемой через протеинкиназу нейронов центральной нервной системы, является уменьшение побочных эффектов леводопы у больных с болезнью Паркинсона. Известно, что при длительном применении леводопы развиваются двигательные нарушения, причиной которых является, в частности, повышение активности РКС-ε и -λ. [22]. В экспериментах на грызунах и приматах выявлена способность тамоксифена уменьшать вызванные леводопой дискинезии, что при изучении нервной ткани полосатого тела соответствовало снижению экспрессии РКС-ε и -λ. Таким образом, представляется реальной перспектива применения тамоксифена для предупреждения и лечения побочных эффектов, связанных с современной противопаркинсонической терапией.

Заключая, следует отметить данные о разнонаправленном воздействии тамоксифена на разные типы РКС в опухолевых клетках с разными молекулярными характеристиками [23]. В частности, в исследовании на культуре клеток рака молочной железы установлено, что в клетках, экспрессирующих рецепторы эстрогенов, тамоксифен активирует РКС-δ, ингибирует РКС-α и подавляет клеточную пролиферацию. В то же время в клетках, не экспрессирующих рецепторов эстрогенов, эффект тамоксифена был иным: замедление пролиферации клеток отмечено при активации РКС-α и подавлении РКС-δ. Механизм этого феномена не понятен, но он, безусловно, интересен и заслуживает дальнейшего изучения.

2. Механизмы антиангиогенного действия тамоксифена

Наличие у тамоксифена антиангиогенного эффекта, который относится к одной из важнейших характеристик препарата, не связанных с рецепторами эстрогенов, не вызывает сомнения [1], но механизмы его реализации продолжают исследоваться.

Так, на культуре эндотелиоцитов пупочной вены установлено, что при воздействии тамоксифена в клетках происходит инактивация белков NPC 1 и 2 типа и связанное с этим накопление холестерина в эндолизосомах в перинуклеарном пространстве эндотелиоцитов [24]. Это приводит к нарушению работы пролиферативного киназного пути mTOR, к перераспределению в клетке рецепторов фактора роста эндотелия сосудов VEGFR2, к нарушению их терминального гликозилирования, что необходимо для фосфорилирования и активации рецепторов. В результате — нарушается VEGF-индуцированная пролифера-

ция эндотелиоцитов. Более того, при воздействии тамоксифена отмечено снижение гликозилирования рецепторов факторов роста тромбоцитов PDGFR β и фибробластов FGFR. Точный механизм этих эффектов до конца не ясен. Предположительно тамоксифен, являясь липофильным соединением, накапливается в эндосомах и повышает в них pH, что приводит к нарушению работы белков NPC и накоплению холестерина.

В культуре клеток рака молочной железы линии MCF-7 с экспрессией рецепторов эстрогенов описан ещё один возможный механизм антиангиогенного эффекта тамоксифена. Показано, что инкубация с антиэстрогеном приводит к повышению концентрации растворимых рецепторов VEGFR2 (sVEGFR2), которые связываясь с рецепторами фактора роста эндотелия сосудов VEGF, блокируют его способность активировать пролиферацию клеток эндотелия и ангиогенез [25].

3. Механизмы проапоптотического и антипролиферативного действия тамоксифена

К настоящему времени в литературе описан ряд новых сведений об участии тамоксифена в процессах апоптоза и подавлении пролиферации.

Например, активно изучается взаимодействие тамоксифена с церамидами, которые участвуют в регуляции клеточного цикла опухолевых клеток и являются индукторами апоптоза. Подробно сведения о механизме этого эффекта церамидов, а также о взаимодействии тамоксифена с сигнальными путями, в которых они участвуют, изложены в обзоре 2015 года [26]. В частности, на культурах клеток различных опухолей, включая колоректальный рак, рак яичников, молочной железы, шейки матки, простаты, а также меланомы, продемонстрировано влияние тамоксифена на разные этапы метаболизма церамидов, ассоциированные с индукцией апоптоза. Подтверждение того, что этот эффект тамоксифена не связан с его антиэстрогенным воздействием, получено при сравнительной оценке эффектов тамоксифена и его метаболита N-десметилтамоксифена со слабой антиэстрогенной активностью. Оказалось, что в последнем случае результат воздействия на метаболизм церамидов был даже более выраженным.

По степени влияния на разные этапы метаболизма церамидов тамоксифен сопоставим со специфическими ингибиторами конкретных ферментов. Но в отличие от последних, к которым часто развивается устойчивость за счёт активации других путей метаболизма церамидов, тамоксифен способен блокировать альтернативные пути и потому более эффективен.

В этой связи интересны результаты работ с

C6-церамидами, которые в настоящее время исследуются как потенциальные противоопухолевые препараты. Эти соединения обладают проапоптотической активностью, сопоставимой с натуральными церамидами, но проблемой является быстрая индукция резистентности. Возможность её преодоления при применении тамоксифена показана на культуре клеток колоректального рака линии LoVo, устойчивых к воздействию как C6-церамида, так и тамоксифена. В то же время при инкубации клеток в присутствии обоих препаратов зарегистрирован цитотоксический эффект и остановка клеточного цикла в фазах G1 и G2, а также ассоциированные с этим расщепление белка PARP, увеличение проницаемости митохондриальных мембран и индукция каспаз-3,7-зависимого апоптоза [27].

Важной мишенью тамоксифена, обеспечивающей его проапоптотическое действие, являются митохондрии. Препарат нарушает работу митохондрий на разных этапах: ингибирует работу 1-5 мембранных комплексов, изменяет текучесть внутренней митохондриальной мембраны и липидное окружение мембранных белков [28]. Это приводит к нарушению окислительного фосфорилирования в митохондриях, к накоплению электронов в комплексах цепи переносчиков и к нехватке АТФ в клетках. При этом образуются свободные формы кислорода, активируется перекисное окисление липидов, выделяются альдегидные производные, повреждающие клетку.

Другим механизмом проапоптотического эффекта тамоксифена, реализующимся при взаимодействии с митохондриями, может быть уменьшение проницаемости митохондриальных мембран за счёт прямого связывания антиэстрогена с белками пор, ингибирования аденин-нуклеотид транспортёров и связывания с циклофилином D [28]. Следствием этого может быть накопление кислорода и его активных форм в митохондриях, а также накопление ионов кальция, активация митохондриальной NO-синтазы и последующее нарушение митохондриального дыхания и стимуляция перекисного окисления липидов. В любом случае итогом будет повреждение митохондрий, высвобождение цитохрома C и индукция апоптоза.

И наконец, в экспериментах на клеточных культурах опухолей разного генеза показано, что тамоксифен может стимулировать митохондриальный путь апоптоза, усиливая экспрессию проапоптотического белка Bax и снижая экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 [29].

Мишенями тамоксифена могут быть ASCT2-транспортёры, ответственные за поступление в клетку нейтральных аминокислот, в том числе глутамина, который участвует в транспорте азота, синтезе различных белков, регулирует работу

ферментов и необходим для синтеза глутатиона — трипептида с выраженными антиоксидантными свойствами. На культуре клеток рака молочной железы с отрицательным статусом рецепторов эстрогенов показано ингибирующее воздействие тамоксифена на ASCT2-транспортёры, что приводило к уменьшению внутриклеточного уровня глутамина и нарушению синтеза глутатиона, к повышению уровня свободных радикалов и оксидативному стрессу, индуцирующему апоптоз [30].

В исследовании на культурах клеток рака молочной железы, позитивных и негативных по статусу рецепторов эстрогенов, при воздействии тамоксифена показано повышение внутриклеточного уровня Zn и индукция оксидативного стресса, предположительно за счёт отщепления ионов цинка от различных Zn-содержащих белков. Эти изменения приводили к увеличению проницаемости лизосомальных мембран и высвобождению катепсина D; сопровождалась активацией MAP-киназы Erk, накоплением аутофаголизосом и активацией аутофагии [31]. Подобные эффекты выявлены и на культурах клеток пигментного эпителия и фоторецепторов сетчатки, что позволило авторам предположить, что индукция аутофагии при воздействии тамоксифена может являться причиной ретинопатии при длительном приёме антиэстрогена [32].

Новой мишенью противоопухолевой терапии, которая активно изучается в настоящее время, являются каннабиноидные рецепторы. В частности, антагонист каннабиноидных CB1-рецепторов римонабант продемонстрировал антипролиферативное действие в культурах клеток рака молочной железы, прямой кишки и щитовидной железы. В исследовании P. L. Prather et al [33] была выявлена способность тамоксифена и его метаболита 4-гидрокситамоксифена выступать в качестве антагонистов CB1- и CB2 рецепторов. Авторы полагают, что это может быть одним из механизмов противоопухолевого действия тамоксифена независимо от статуса рецепторов эстрогенов в ткани опухоли.

На культуре нейронов показано, что тамоксифен индуцирует апоптоз, активируя работу мембранных VDAC-каналов (voltage-dependent anion channel) [34]. На культуре клеток микроглии выявлена также способность тамоксифена стимулировать рецептор-опосредованный путь апоптоза: отмечено повышение уровня Fas и Fas-лиганда, ответственных за активацию белка FADD, активирующего путь апоптоза, ассоциированный с активностью каспаз 8 и 10 [29].

Интересные результаты получены при изучении влияния тамоксифена на клетки холангиокарциномы. Установлено, что тамоксифен воздействует на ряд мишеней, запускающих проапоптотические каскады: блокирует работу кальмодулина; ингибирует активность ряда инги-

биторов Fas-опосредованного апоптоза; стимулирует выход из митохондрий цитохрома C; активирует каспазы 2, 3, 8, 9 и 10. Все эти эффекты приводили к индукции тамоксифеном апоптоза *in vitro* и к замедлению роста опухоли *in vivo* [35, 36]. Проапоптотическое действие метаболита тамоксифена 4-гидрокситамоксифена на клетки рабдомиосаркомы *in vitro* и связанная с этим остановка клеточного цикла в фазе G1 ассоциированы с подавлением фосфорилирования белка ретинобластомы Rb и с активацией каспаз 3 и 7 [37].

В 2013 г. опубликованы данные о способности тамоксифена индуцировать *in vitro* апоптоз лейкоцитов, полученных из крови и бронхоальвеолярных смывов у лошадей [38]. Это послужило поводом для проведения исследования по оценке эффективности тамоксифена у лошадей с воспалительными заболеваниями лёгких. При применении тамоксифена выявлено снижение содержания лейкоцитов в бронхоальвеолярных смывах, сопоставимое с эффектом дексаметазона, а также положительная динамика течения заболевания [39]. Это исследование делает перспективным дальнейшее изучение механизмов индукции апоптоза лейкоцитов при воздействии тамоксифена и противовоспалительного действия антиэстрогена.

4. Антиметастатический эффект тамоксифена

При воздействии тамоксифена показано снижение миграционной активности (метастатического потенциала) клеток гепатоцеллюлярной карциномы *in vitro*, которое было ассоциировано с ингибированием РКС и с изменением тока хлора через хлоридные ClC-3-каналы [40]. Подобный опосредованный ингибированием РКС антиметастатический эффект тамоксифена, сопровождающийся нарушением подвижности клеток, продемонстрирован в культуре клеток глиобластомы [2]. Кроме того, *in vitro* показано, что метаболит тамоксифена эндоксифен подавляет миграцию клеток меланомы, при этом авторы связали этот эффект антиэстрогена со стимуляцией экспрессии ингибитора циклин-зависимой киназы 1B-p27 [41].

5. Ингибирование лекарственной устойчивости

Ранее было показано, что, напрямую связываясь с Р-гликопротеином (Pgp) и другими белками множественной лекарственной резистентности, тамоксифен препятствует её реализации и потенцирует действие цитостатиков [1].

Недавно опубликованы данные, что подавление активности Pgp тамоксифеном может реализоваться и опосредованно: усиление цитотоксичности цисплатина, 5-фторурацила и

доксорубицина в культуре клеток рака желудка сопровождалось снижением экспрессии Pgr и ингибированием различных эффекторов сигнального пути PI3K/Akt [42].

6. Противопаразитарный, противогрибковый, противобактериальный и противовирусный эффекты

Противопаразитарное, противогрибковое, противобактериальное и противовирусное действие — ещё одна не до конца понятная «ниша» эффектов тамоксифена.

Недавно показано, что тамоксифен эффективен в отношении эхинококка *in vivo* и *in vitro*. После воздействия антиэстрогена у эхинококков наблюдались потеря присосок и крючьев, повреждения оболочки, а у мышей, зараженных эхинококком, продемонстрировано паразитостатическое действие препарата [43]. В экспериментах *in vitro* [44] и *in vivo* на лабораторных мышах [45] продемонстрирован и противоположный эффект тамоксифена.

Помимо этого тамоксифен проявляет противогрибковый эффект. В частности, препарат продемонстрировал эффективность при криптококкозе, что объясняется способностью тамоксифена нарушать функции кальмодулина. *In vitro* при воздействии тамоксифена выявлено подавление роста криптококков и клеток шизосахаромицета, а *in vivo* отмечен агонизм противогрибкового действия флуконазола с тамоксифеном [46, 47].

Интересны данные о противотуберкулёзном действии тамоксифена. *In vitro* продемонстрировано токсическое воздействие препарата на чувствительные и резистентные к антибиотикам штаммы *M. tuberculosis*, в том числе и на внутримакрофагальные формы, при этом эффект был выше в сравнении с традиционными противотуберкулёзными препаратами — изониазидом и рифампицином [48].

И наконец, на культуре клеток гепатомы тамоксифен проявил противовирусное действие в отношении вируса гепатита С (HCV). Установлено, что препарат блокирует вирусный цикл на всех этапах: прикрепления и входа вируса в клетку, репликации вируса и пострепликационных изменений, а также выхода вируса из клетки. Точные мишени реализации этих эффектов тамоксифена не известны, но авторы исследования предполагают вовлечение многих упомянутых выше молекул: PKC, Pgr, кальмодулина и других [49].

Заключение

Недавно, в заглавии одной из своих статей автор и неизменный научный, идейный вдохновитель тамоксифена профессор V. Craig Jordan на-

писал: «Это препарат, который продолжает преподносить подарки» [50]. Maneesh N. Singh назвал тамоксифен «аспирином XXI века» [51]. И действительно, несмотря на более чем 40-летнюю историю применения тамоксифена, в настоящее время становится понятно, что его возможности не используются в полной мере. В таблице представлены сведения об эффектах тамоксифена, не связанных с его антиэстрогенной активностью. Суммированы данные, которые обсуждались в предыдущем обзоре литературы (выделены курсивом) [1] и в настоящем сообщении.

Выявлено множество механизмов действия тамоксифена, приводящих к программированной смерти клеток. Препарат стимулирует как рецептор-зависимый, так и митохондриальный пути апоптоза. В частности, в митохондриях выявлено большое количество мишеней тамоксифена: он взаимодействует с участниками цепи переноса электронов и с белками пор митохондриальных мембран, изменяет экспрессию Bcl-2 и Bax и др. Внешний путь апоптоза также может активироваться тамоксифеном, который повышает экспрессию Fas и Fas-L и, наоборот, — снижает экспрессию ингибиторов этого пути апоптоза. Ещё одной важной мишенью тамоксифена оказались лизосомы, в которых тамоксифен интенсифицирует выделение катепсина D и как результат — активирует аутофагию. И наконец, установлена способность препарата предотвращать утилизацию проапоптотических липидов церамидов, активировать белок фосфатазы PP2A, блокировать каннабиноидные рецепторы, ингибировать поступление глутамина в клетки, стимулировать раскрытие VDAC-каналов, подавлять фосфорилирование белка ретинобластомы Rb и др. Все эти эффекты через определённые каскады приводят к клеточной смерти.

Изучены и другие эффекты тамоксифена. В том числе его антиангиогенная активность объяснена изменением поведения лизосом и нарушением работы mTORC1 в клетках эндотелия. А на примере клеток рака желудка выявлена способность тамоксифена опосредованно через PI3K/Akt-путь подавлять экспрессию белков лекарственной устойчивости и за счёт этого повышать чувствительность к цитостатикам.

Неожиданными оказались результаты исследований противопаразитарной, противогрибковой, противобактериальной и противовирусной активности тамоксифена. Препарат продемонстрировал эффективность в отношении возбудителей различных паразитарных и грибковых заболеваний, микобактерий туберкулёза, вирусов гепатита С. С учётом того, что широкое распространение этих заболеваний является актуальной эпидемиологической проблемой, мы надеемся, что активное изучение эффективности тамокси-

Биологические эффекты тамоксифена, реализующиеся независимо от статуса рецепторов эстрогенов опухоли

Биологические эффекты тамоксифена	Механизмы реализации биологических эффектов тамоксифена
Стимуляция программированной смерти и подавление пролиферации клеток	Активация: каспаз 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10; киназы JNK ¹ ; проапоптотических белков p53, p38, FasL, Bax и трансформирующего фактора роста TGF- β . Ингибирование: антиапоптотического белка Bcl-2, проапоптотического белка кальмодулина и протеинкиназы C. Активация: каспаз 7*, 8*, 9*; проапоптотического белка FasL*; перекисного окисления липидов; выхода катепсина D из лизосом; открытия VDAC-каналов ³ , участвующих в активации апоптоза. Ингибирование: протеинкиназы C*; фосфорилирования белка ретинобластомы Rb ⁴ ; экспрессии транспортера глутамин ASCT2 ⁵ ; утилизации церамидов. Антагонизм с рецепторами CB1, CB2 ⁶
Ингибирование ангиогенеза	Активация: IL-1Ra ⁷ — антагониста рецептора интерлейкина 1. Ингибирование: фактора роста эндотелия сосудов VEGF ⁸ ; основного фактора роста фибробластов bFGF ⁹ и синтеза ангиогенина. Повышение концентрации растворимых рецепторов VEGFR2 ¹⁰ , их связывание VEGF ⁸ . Ингибирование: PI3K ¹¹ /Akt ¹² /mTOR ¹³ -сигнального пути, стимулирующего пролиферацию сосудов; активации рецепторов VEGFR2 ¹⁰ , PDGFR β ¹⁴ и FGFR ¹⁵ .
Подавление инвазии и метастазирования	Активация: ингибитора металлопротеиназ TIMP1 ¹⁶ ; рецептора урокиназы — uPAR ¹⁷ и матричных металлопротеиназ MMP ¹⁸ 7 и 9. Активация: ингибитора циклин-зависимой киназы 1B. Ингибирование: протеинкиназы C*.
Ингибирование механизма множественной лекарственной резистентности	Прямое ингибирование функции белков множественной лекарственной резистентности — связывание с Pgp ¹⁹ , MRP ²⁰ и LRP ²¹ Опосредованное ингибирование функции белков множественной лекарственной резистентности — ингибирование сигнального пути PI3K ¹¹ /Akt ¹² /mTOR ¹³ .

Примечание. Курсивом выделены мишени тамоксифена, описанные ранее в обзоре 2012 г. * — результаты, подтвержденные в новых исследованиях. ¹JNK — c-Jun N-концевая киназа; ²TGF- β — трансформирующий ростовой фактор β ; ³VDAC — потенциал-зависимые анионные каналы; ⁴Rb — белок ретинобластомы; ⁵ASCT2 — транспортер глутамин; ⁶CB1- и CB2 — каннабиноидные рецепторы; ⁷IL-1Ra — антагонист рецептора интерлейкина 1; ⁸VEGF — фактор роста эндотелия сосудов; ⁹bFGF — основной фактор роста фибробластов; ¹⁰VEGFR2 — рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2; ¹¹PI3K — фосфоинозитид-3-киназа; ¹²Akt — протеинкиназа B; ¹³mTOR — «Мишень рапамицина у млекопитающих»; ¹⁴PDGFR β — рецептор фактора роста тромбоцитов β ; ¹⁵FGFR — рецептор фактора роста фибробластов; ¹⁶TIMP-1 — тканевой ингибитор металлопротеиназ-1; ¹⁷uPAR — рецептор урокиназы; ¹⁸MMP — матриксная металлопротеиназа; ¹⁹Pgp — Р-гликопротеин; ²⁰MRP — белок, ассоциированный с множественной лекарственной резистентностью; ²¹LRP — белок, ассоциированный с резистентностью рака легкого.

фена в этой совершенно нетрадиционной для него области может себя оправдать.

Важно, что, по крайней мере, часть описанных в статье молекулярных феноменов уже удалось связать с клиническими наблюдениями. Клинически значимыми являются антимиокальный эффект тамоксифена, способность препарата купировать побочные проявления терапии болезни Паркинсона, а также результаты ветеринарного исследования на лошадях, выявившего положительный эффект тамоксифена на течение бронхиальной астмы у лошадей.

Интересны результаты применения тамоксифена в клинической практике при терапии глиобластомы и рака поджелудочной железы, как в монотерапии, так и в комбинации с противоопухолевыми препаратами, в том числе и при резистентности, зарегистрированной на предшествующих курсах химиотерапии. Важно заметить, что в данном обзоре приведены лишь некоторые примеры эффективности применения тамоксифена

при терапии злокачественных новообразований. Эти наблюдения значительно шире и по спектру опухолей, и по спектру противоопухолевых лекарств, в том числе и таргетных, в комбинации с которыми тамоксифен использовался. Но это тема другого сообщения.

Заклучая, следует ещё раз подчеркнуть уникальность тамоксифена, который обладает целым рядом интересных, клинически значимых, но до конца не познанных эффектов помимо антиэстрогенного действия. Уже в настоящее время достаточно сведений о молекулярных эффектах тамоксифена для пересмотра показаний к применению препарата только в онкологической практике и только при гормональной терапии позитивного по статусу рецепторов эстрогенов рака молочной железы. Безусловно, области и показания для применения тамоксифена гораздо шире, и постоянный (на протяжении более 50 лет!) интерес к этому препарату исследователей из разных областей науки и клинических исследований

подтверждает правильность такого представления. Надеемся, что представленный новый блок сведений об этом уникальном лекарстве окажется полезным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bogush T., Dudko E., Bogush E. et al. Tamoxifen non-estrogen receptor mediated molecular targets. *Oncol Rev* 2012; 6: 2: e15.
2. Balça-Silva J., Matias D., do Carmo A. et al. Tamoxifen in combination with temozolomide induce a synergistic inhibition of PKC- α in GBM cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850: 4: 722–732.
3. Yang L., Yuan X., Wang J. et al. Radiosensitization of human glioma cells by tamoxifen is associated with the inhibition of PKC- ϵ activity *in vitro*. *Oncol Lett* 2015; 10: 1: 473–478.
4. Couldwell W. T., Hinton D. R., Surnock A. A. et al. Treatment of recurrent malignant gliomas with chronic oral high-dose tamoxifen. *Clinical cancer research: an Official J American Association for Cancer Research* 1996; 2: 4: 619–622.
5. Chamberlain M. C., Kormanik P. A. Salvage chemotherapy with tamoxifen for recurrent anaplastic astrocytomas. *Arch Neurol* 1999; 56: 6: 703–708.
6. Mastronardi L., Puzilli F., Couldwell W. T. et al. Tamoxifen and carboplatin combinational treatment of high-grade gliomas. Results of a clinical trial on newly diagnosed patients. *J Neuro-Oncol* 1998; 38: 1: 59–68.
7. Tang P., Roldan G., Brasher P. M. et al. A phase II study of carboplatin and chronic high-dose tamoxifen in patients with recurrent malignant glioma. *J Neuro-Oncol* 2006; 78: 3: 311–316.
8. Cristofori A., Carrabba G., Lanfranchi G. et al. Continuous tamoxifen and dose-dense temozolomide in recurrent glioblastoma. *Anticancer Res* 2013; 33: 8: 3383–3389.
9. Kohli L., Kaza N., Coric T. et al. 4-Hydroxytamoxifen induces autophagic death through K-Ras degradation. *Cancer Res* 2013; 73: 14: 4395–4405.
10. Xie X., Wu M. Y., Shou L. M. et al. Tamoxifen enhances the anticancer effect of cantharidin and norcantharidin in pancreatic cancer cell lines through inhibition of the protein kinase C signaling pathway. *Oncol Lett* 2015; 9: 2: 837–844.
11. Keating J. J., Johnson P. J., Cochrane A. M. et al. A prospective randomised controlled trial of tamoxifen and cyproterone acetate in pancreatic carcinoma. *Brit J Cancer* 1989; 60: 5: 789–792.
12. Theve N. O., Pousette A., Carlström K. Adenocarcinoma of the pancreas—a hormone sensitive tumor? A preliminary report on Nolvadex treatment. *Clin Oncol* 1983; 9: 3: 193–197.
13. Wong A., Chan A. Survival benefit of tamoxifen therapy in adenocarcinoma of pancreas. A case-control study. *Cancer* 1993; 71: 7: 2200–2203.
14. Morita S., Motohara T., Ogawa K., Horimi T. Hormone therapy using tamoxifen in unresectable carcinoma of the pancreas—preliminary study. *Nihon Igaku Hōshasen Gakkai zasshi. Nipp Acta Radiol* 1992; 52: 12: 1686–1688.
15. Lamy R., Conroy T., Brunaud L., Bresler L. Tamoxifen for metastatic pancreatic adenocarcinoma: a complete response. *Gastroentérol Clin Biol* 2001; 25: 10: 912–913.
16. Wenger F. A., Zieren H. U., Jacobi C. A., Müller J. M. Hormone therapy of postoperative recurrent pancreatic carcinoma with octreotide and tamoxifen. *Langenbecks Archiv Für Chirurgie. Supplement. Kongressband* 1998; 115: 1348–1350.
17. Rosenberg L., Barkun A. N., Denis M. H., Pollak M. Low dose octreotide and tamoxifen in the treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer* 1995; 75: 1: 23–28.
18. Patel B. M., Desai V. J. Beneficial role of tamoxifen in experimentally induced cardiac hypertrophy. *Pharmacol Reports* 2014; 66: 2: 264–272.
19. Kuo J. R., Wang C. C., Huang S. K., Wang S. J. Tamoxifen depresses glutamate release through inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ entry and protein kinase C α in rat cerebral cortex nerve terminals. *Neurochem International* 2012; 60: 2: 105–114.
20. Steckert A. V., Valvassori S. S., Mina F. et al. Protein kinase C and oxidative stress in an animal model of mania. *Curr Neurovascul Res* 2012; 9: 1: 47–57.
21. Armani F., Andersen M. L., Galduróz J. C. Tamoxifen use for the management of mania: a review of current preclinical evidence. *Psychopharmacology* 2014; 231: 4: 639–649.
22. Smith C. P., Oh J. D., Bibbiani F. et al. Tamoxifen effect on L-DOPA induced response complications in parkinsonian rats and primates. *Neuropharmacology* 2007; 52: 2: 515–526.
23. Li Z., Wang N., Fang J. et al. Role of PKC-ERK signaling in tamoxifen-induced apoptosis and tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Oncol Reports* 2012; 27: 6: 1879–1886.

Выполнено при поддержке РФФИ (гранты 15-04-06991-а и 16-34-01049-мол-а) и гранта Президента Российской Федерации МК-7709.2016.7.

24. Shim J. S., Li R. J., Lv J. et al. Inhibition of angiogenesis by selective estrogen receptor modulators through blockade of cholesterol trafficking rather than estrogen receptor antagonism. *Cancer Lett* 2015; 362: 1: 106–115.
25. Garvin S., Nilsson U. W., Dabrosin C. Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells. *Brit J Cancer* 2005; 93: 9: 1005–1010.
26. Morad S. A., Cabot M. C. Tamoxifen regulation of sphingolipid metabolism—therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851: 9: 1134–1145.
27. Morad S. A., Madigan J. P., Levin J. C. et al. Tamoxifen magnifies therapeutic impact of ceramide in human colorectal cancer cells independent of p53. *Biochem Pharmacol* 2013; 85: 8: 1057–1065.
28. Ribeiro M. P., Santos A. E., Custódio J. B. Mitochondria: the gateway for tamoxifen-induced liver injury. *Toxicology* 2014; 323: 10–18.
29. Li Z., Chen J., Lei T., Zhang H. Tamoxifen induces apoptosis of mouse microglia cell line BV-2 cells via both mitochondrial and death receptor pathways. *J Huazhong Univer Science Technol. Medical Sciences* 2012; 32: 2: 221–226.
30. Todorova V. K., Kaufmann Y., Luo S., Klimberg V. S. Tamoxifen and raloxifene suppress the proliferation of estrogen receptor-negative cells through inhibition of glutamine uptake. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67: 2: 285–291.
31. Hwang J. J., Kim H. N., Kim J. et al. Zinc(II) ion mediates tamoxifen-induced autophagy and cell death in MCF-7 breast cancer cell line. *BioMetals* 2010; 23: 6: 997–1013.
32. Cho K. S., Yoon Y. H., Choi J. A. et al. Induction of autophagy and cell death by tamoxifen in cultured retinal pigment epithelial and photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2012; 53: 9: 5344–5353.
33. Prather P. L., Francis Devaraj F., Dates C. R. et al. CB1 and CB2 receptors are novel molecular targets for Tamoxifen and 4OH-Tamoxifen. *Biochem Biophys Res Com* 2013; 441: 2: 339–343.
34. Herrera J. L., Diaz M., Hernández-Fernaund J. R. et al. Voltage-dependent anion channel as a resident protein of lipid rafts: post-transductional regulation by estrogens and involvement in neuronal preservation against Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2011; 116: 5: 820–827.
35. Pawar P., Ma L., Byon C. H. et al. Molecular mechanisms of tamoxifen therapy for cholangiocarcinoma: role of calmodulin. *Clin Cancer Res: Official J Amer Assoc Cancer Res* 2009; 15: 4: 1288–1296.
36. Jing G., Yuan K., Turk A. N. et al. Tamoxifen enhances therapeutic effects of gemcitabine on cholangiocarcinoma tumorigenesis. *Lab Investigat; J Techn Meth Pathol* 2011; 91: 6: 896–904.
37. Cimica V., Smith M. E., Zhang Z. et al. Potent inhibition of rhabdoid tumor cells by combination of flavopiridol and 4OH-tamoxifen. *BMC Cancer* 2010; 10: 634.
38. Perez B., Henriquez C., Sarmiento J. et al. Tamoxifen as a new therapeutic tool for neutrophilic lung inflammation. *Respirology* 2016; 21: 1: 112–118.
39. Sarmiento J., Perez B., Morales N. et al. Apoptotic effects of tamoxifen on leukocytes from horse peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid. *Leuk Res Com* 2013; 37: 4: 333–338.
40. Mao J., Yuan J., Wang L. et al. Tamoxifen inhibits migration of estrogen receptor-negative hepatocellular carcinoma cells by blocking the swelling-activated chloride current. *J Cell Physiol* 2013; 228: 5: 991–1001.
41. Ribeiro M. P., Silva F. S., Paixão J. et al. The combination of the anti-estrogen endoxifen with all-trans-retinoic acid has anti-proliferative and anti-migration effects on melanoma cells without inducing significant toxicity in non-neoplastic cells. *Europ J Pharmacol* 2013; 715: 1–3: 354–362.
42. Mao Z., Zhou J., Luan J. et al. Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2014; 68: 2: 179–183.
43. Nicolao M. C., Elissondo M. C. et al. *In vitro* and *in vivo* effects of tamoxifen against larval stage *Echinococcus granulosus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 9: 5146–5154.
44. Miguel D. C., Yokoyama-Yasunaka J. K., Andreoli W. K. et al. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 3: 526–534.
45. Miguel D. C., Zauli-Nascimento R. C., Yokoyama-Yasunaka J. K. et al. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 2: 365–368.

46. Butts A., Koselny K., Chabrier-Roselló Y. et al. Estrogen receptor antagonists are anti-cryptococcal agents that directly bind EF hand proteins and synergize with fluconazole *in vivo*. *mBio* 2014; 5: 1: e00765—00713.
47. Zhang X., Fang Y., Jaiseng W. et al. Characterization of tamoxifen as an antifungal agent using the yeast *Schizosaccharomyces pombe* model organism. *Kobe J Med Sci* 2015; 61: 2: E54—63.
48. Jang W. S., Kim S., Podder B. et al. Anti-mycobacterial activity of tamoxifen against drug-resistant and intra-macrophage *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Biotechnol* 2015; 25: 6: 946—950.
49. Murakami Y., Fukasawa M., Kaneko Y. et al. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microb Infect/Institut Pasteur* 2013; 15: 1: 45—55.
50. Jordan V. C. Tamoxifen as the first successful targeted therapy in cancer: the gift that kept on giving. *Breast Cancer Manag* 2014; 3: 4: 321—326.
51. Singh M. N., Martin-Hirsch P. L., Martin F. L. The multiple applications of tamoxifen: an example pointing to SERM modulation being the aspirin of the 21st century. *Med Sci Monitor: Internat Med J Exper Clin Res* 2008; 14: 9: RA144—148.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Богуш Татьяна Анатольевна — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией медицинской химии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

Полежаев Борис Борисович — студент, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова

Дудко Евгений Александрович — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория медицинской химии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

Богуш Елена Александровна — к.м.н., старший научный сотрудник, хирургическое отделение № 2 (диагностики опухолей), ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

Кирсанов Владимир Юрьевич — к.м.н., научный сотрудник, хирургическое отделение № 2 (диагностики опухолей), ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

Полоцкий Борис Евсеевич — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник, хирургическое торакальное отделение, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

Тюляндин Сергей Алексеевич — д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

Давыдов Михаил Иванович — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

ПРОГРАММА ИННОВАЦИОННОГО МЕДИЦИНСКОГО ПРОЕКТА «НОВЫЕ ЛЕКАРСТВА ПРОТИВ ОПАСНЫХ ПАТОГЕНОВ»: ЕВРОПЕЙСКОЕ ОБЩЕСТВЕННО-ЧАСТНОЕ ПАРТНЁРСТВО В РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ СТРАТЕГИЙ ПРЕОДОЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ.

THE INNOVATIVE MEDICINES INITIATIVE'S NEW DRUGS FOR BAD BUGS PROGRAMME: EUROPEAN PUBLIC-PRIVATE PARTNERSHIPS FOR THE DEVELOPMENT OF NEW STRATEGIES TO TACKLE ANTIBIOTIC RESISTANCE / T. KOSTYANEV, M. J. M. BONTEN, S. O'BRIEN, H. STEEL, S. ROSS, B. FRANÇOIS, E. TACCONELLI, M. WINTERHALTER, R. A. STAVENGER, A. KARLÉN, S. HARBARTH, J. HACKETT, H. S. JAFRI, C. VUONG, A. MACGOWAN, A. WITSCHI, G. ANGYALOSI, J. S. ELBORN, R. DEWINTER, H. GOOSSENS*// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 2: 290—295.

Антибиотикоустойчивость (АУ) представляет глобальную угрозу здравоохранению. Несмотря на появление высокоустойчивых микроорганизмов и насущную потребность в новых лекарствах, разработка антибактериальных средств замедлилась до неприемлемого уровня в мировых масштабах. Многочисленные правительственные и неправительственные органы призывают общественно-частные партнёрства и инновационные финансовые механизмы обратиться к этой проблеме. Ответной реакцией на кризис в здравоохранении было инвестирование более 660 млн евро по совокупной программе Инновационного медицинского проекта (IMI) в разработку новых антибактериальных стратегий под наблюдением со стороны Европейской Комиссии и Европейской федерации фармацевтических производств и ассоциаций. Главной целью программы IMI «Новые лекарства против опасных патогенов» (ND4BB) является поддержка борьбы с АУ на всех уровнях: от фундаментальной науки и открытия новых лекарственных веществ совместно с клиническими исследованиями до моделей бизнеса и ответственного применения антибиотиков. Для достижения этой цели в рамках ND4BB было запущено 7 проектов. Четыре из них будут включать клинические испытания новых противомикробных соединений, а также эпидемиологические исследования в беспрецедентном масштабе, что расширит представление об АУ и отдельных патогенах и усовершенствует схемы клинических испытаний новых лекарств. Потребность в быстром совместном действии привела к финансированию 7 актуальных проектов, каждый из которых должен значительно способствовать прогрессу в борьбе с АУ. ND4BB включает экспертизу и создаёт платформу, где ответственность и ресурсы, необходимые для всех

участников, объединены в совместной инициативе общественно-частного партнёрства в беспрецедентном масштабе.

* Laboratory of Medical Microbiology, VAXINFECTIO, Campus Drie Eiken, Universiteitsplein 1, 2610 Antwerp, Belgium.

МНОГОЛЕТНЕЕ МЕЖДУНАРОДНОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ И ГЛОБАЛЬНОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ENTEROBACTERIACEAE И PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗЫ.

MULTIYEAR, MULTINATIONAL SURVEY OF THE INCIDENCE AND GLOBAL DISTRIBUTION OF METALLO- β -LACTAMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA/K. M. KAZMIERCZAK*, S. RABINE, M. HACKEL, R. E. MCLAUGHLIN, D. J. BIEDENBACH, S. K. BOUCHILLON, D. F. SAHM, P. A. BRADFORD// ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY FEBRUARY 2016; 60: 2: 1067—1078.

Металло- β -лактамазы (МБЛ) гидролизуют все классы бета-лактамов, кроме монобактамов, и не подавляются классическими ингибиторами сериновых бета-лактамаз. В рамках глобального инспекционного обследования 2012—2014 гг. от инфицированных больных 202 медицинских центров в 40 странах были выделены грамотрицательные возбудители инфекций. Методами ПЦР и секвенирования не чувствительные к карбапенемам Enterobacteriaceae и *Pseudomonas aeruginosa* были охарактеризованы по *bla* генам, кодирующим VIM, IMP, NDM, SPM и GIM варианты бета-лактамаз. Коллекция включала 471 штамм следующих видов патогенных бактерий-продуцентов МБЛ (количество изолятов дано в скобках): *P. aeruginosa* (308), *Klebsiella* spp. (85), *Enterobacter* spp. (39), *Proteaeae* (16), *Citrobacter freundii* (12), *Escherichia coli* (6) и *Serratia marcescens* (5), полученных из 34 стран: Россия (72), Греция (61), Филиппины (54), Венесуэла (29) и Кувейт, Нигерия, Румыния, Южная Африка и Таиланд (каждая страна по 20—25 изолятов). Всего было установлено 32 варианта МБЛ (14 VIM, 14 IMP и 4 NDM). В ходе исследования было выделено 7 новых вариантов МБЛ, отличающихся от ранее описанных одним замещением аминокислоты: VIM-42 (VIM-1 [V223I]), VIM-43 (VIM-4 [A24V]), VIM-44 (VIM-2 [K257N]), VIM-45 (VIM-2 [T35I]), IMP-48 (IMP-14 [I69T]), IMP-49 (IMP-18 [V49F]), и NDM-16 (NDM-1 [R264H]). Активность *in vitro* всех испытанных антибиотиков в отношении МБЛ-продуцирующих Enterobacteriaceae была существенно снижена, за исключением азтреонама-авибактама (МПК₉₀,

0,5—1 мкг/мл), самым эффективным в отношении МБЛ-продуцирующих штаммов *P.aeruginosa* был колистин (97% чувствительность). Хотя в глобальном масштабе количество (%%) штаммов, содержащих МБЛ, остаётся относительно низким, их выявление у 12 видов микроорганизмов, в 34 странах и во всех регионах, участвующих в инспекционном обследовании, вызывает озабоченность.

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

ПОЧВЕННАЯ МИКРОБИОТА СОДЕРЖИТ МНОГООБРАЗНЫЕ КАРБАПЕНЕМ-ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТЬЮ.

THE SOIL MICROBIOTA HARBORS A DIVERSITY OF CARBAPENEM-HYDROLYZING β -LACTAMASES OF POTENTIAL CLINICAL RELEVANCE/D. D. GUDETA, V. BORTOLAIA, G. AMOS, E. M. H. WELLINGTON, K. K. BRANDT, L. POIREL, J. B. NIELSEN, H. WESTH, L. GUARDABASSI* // *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* JANUARY 2016; 60: 1: 151—160.

Происхождение карбапенем-гидролизующих металло-бета-лактамаз (МБЛ), приобретаемых клиническими бактериями, в основном неизвестно. Исследовали частоту, пределы множественности, разнообразие и функциональность МБЛ почвенной микробиоты. Двадцать пять образцов почв разного типа и географического происхождения были проанализированы селективным культивированием с добавлением антимикробных соединений, последующим фенотипическим тестированием и экспрессией МБЛ-кодирующих генов в *Escherichia coli*, а также секвенированием целого генома МБЛ-продуцирующих штаммов. Карбапенемазная активность была выявлена у 29 штаммов бактерий из 13 образцов почв, что позволило идентифицировать 7 новых МБЛ в предполагаемых *Pedobacter roseus* (PEDO-1), *Pedobacter borealis* (PEDO-2), *Pedobacter kyungheensis* (PEDO-3), *Chryseobacterium piscium* (CPS-1), *Epilithonimonas tenax* (ESP-1), *Massilia oculi* (MSI-1), *Sphingomonas* sp. (SPG-1). Похоже, что образование карбапенемазы является свойством, присущим *Chryseobacterium* и *Epilithonimonas*, т. к. наблюдалось у референс-штаммов разных видов в пределах этих родов. Аминокислотная идентичность с МБЛ, описанными у клинических бактерий, была в пределах 40—69%. Отличительными чертами новых бета-лактамаз были профаговая интеграция кодирующего гена (PEDO-1), необычный аминокислотный остаток в ключевом положении структуры МБЛ и катализа (CPS-1) и частичное «перекрытие» с предполагаемой OXA бета-лактамазой (MSI-1). Гетерологич-

ная экспрессия PEDO-1, CPS-1 и ESP-1 в *E.coli* значительно увеличивала МПК ампициллина, цефтазидима, цефподоксима, цефокситина и меропенема. Исследование показало, что продуценты МБЛ широко распространены в почве и включают 4 рода, ранее неизвестные как продуценты МБЛ. Образованные этими бактериями МБЛ, отдалённо родственны МБЛ, полученным из клинических образцов, но конститутивные детерминанты устойчивости представляют клиническую значимость при попадании в патогенные бактерии.

* Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark.

IN VITRO ОЦЕНКА КОМБИНАЦИЙ ДВУХ КАРБАПЕНЕМОВ В ОТНОШЕНИИ ПРОДУЦИРУЮЩИХ КАРБАПЕНЕМАЗЫ ENTEROBACTERIACEAE.

IN VITRO EVALUATION OF DUAL CARBAPENEM COMBINATIONS AGAINST CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE /L. POIREL*, N. KIEFFER, P. NORDMANN// *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY* 2016; 71: 1: 156—161.

Была проанализирована *in vitro* активность комбинаций из двух карбапенемов в отношении *Klebsiella pneumoniae*, образующей основные типы карбапенемаз. Были определены значения МПК карбапенемов: имипенема, меропенема, эртапенема и дорипенема как по отдельности, так и их двойных комбинаций в отношении 20 клинических штаммов *K.pneumoniae*, продуцирующих основные карбапенемазы: OXA-48 ($n=6$), NDM-1 ($n=4$), NDM-1+OXA-48 ($n=2$) и KPC-2 ($n=8$). Также были определены МПК для рекомбинантных, образующих NDM-1, OXA-48 и KPC-2 штаммов *Escherichia coli* с нарушениями проницаемости и без них. Тестирование *in vitro* синергидного действия комбинации было выполнено методами микроразведений и «шахматной доски». Для установления синергизма, индифферентности или антагонизма действия комбинации были определены индексы фракционной ингибиторной концентрации. Все продуценты карбапенемаз были устойчивы к испытанным карбапенемам, у большинства штаммов значения МПК карбапенемов были >32 мг/л. Ни одна комбинация не была антагонистической. Синергидное действие в отношении продуцентов KPC наблюдали у комбинаций: имипенем-эртапенем (5/8 штаммов), имипенем-дорипенем (4/8), меропенем-дорипенем (3/8), эртапенем-дорипенем (3/8), синергидное действие отсутствовало у комбинации меропенем-эртапенем. В отношении продуцентов

ОХА-48 синергизм был отмечен для комбинации имипенем-эртапенем, и у двух штаммов — имипенем-меропенем. Примечательно, что комбинация имипенема с некарбапенемным бета-лактамом (цефалотин) не обладала синергидным действием. Синергизма не наблюдали в отношении всех продуцентов NDM-1 и NDM-1+ОХА-48. Исследования «time-kill» подтвердили большинство результатов, полученных методом «шахматной доски». Результаты убедительно подтверждают предположение, что комбинации из двух карбапенемов могут быть эффективными в отношении продуцентов сериновых бета-лактамаз (KPC, ОХА-48) Наибольшей эффективностью характеризовались комбинации, содержащие имипенем.

* Medical and Molecular Microbiology 'Emerging Antibiotic Resistance' Unit, Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland.

IN VITRO АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СИДЕРОФОРНОГО ЦЕФАЛОСПОРИНА S-649266 В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ENTEROBACTERIACEAE, ВКЛЮЧАЯ УСТОЙЧИВЫЕ К КАРБАПЕНЕМАМ.

IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A SIDEROPHORE CEPHALOSPORIN, S-649266, AGAINST ENTEROBACTERIACEAE CLINICAL ISOLATES, INCLUDING CARBAPENEM-RESISTANT STRAINS / N. KOHIRA*, J. WEST, A. ITO, T. ITO-HORIYAMA, R. NAKAMURA, T. SATO, S. RITTENHOUSE, M. TSUJI, Y. YAMANO// ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY FEBRUARY 2016; 60: 2: 729–734.

S-649266 — новый сидерофорный цефалоспориновый антибиотик, содержащий катехольный остаток в положении-3 боковой цепи. Для оценки антимикробной активности S-649266 в отношении Enterobacteriaceae использовали две коллекции клинических штаммов, включающие 617 распространённых штаммов, собранных в 2009 и 2011 гг. (1-й набор), и 233 продуцента бета-лактамаз, в т.ч. 47 KPC, 49 NDM, 12 VIM и 8 IMP (2-й набор). В первой части коллекции штаммов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* и *Enterobacter cloacae* значения МПК₉₀ S-649266 составляли в целом ≤ 1 мкг/мл, только 8 (1,3%) штаммов из 617 имели значения МПК ≥ 8 мкг/мл. Во второй части коллекции значения МПК S-649266 были равны ≤ 4 мкг/мл у 109 из 116 продуцентов KPC и металло-карбапенемаз (класс В). У каждого из 13 штаммов, продуцирующих другие типы карбапенемаз, именно SME,

NMC и ОХА-48, значения МПК S-649266 составили ≤ 2 мкг/мл. Механизмы снижения чувствительности у 7 штаммов — продуцентов карбапенемаз класса В со значениями МПК ≥ 16 мкг/мл не были определены. Настоящее исследование является первым, продемонстрировавшим значительную антимикробную активность нового сидерофорного цефалоспорина S-649266 в отношении представителей Enterobacteriaceae, включая штаммы, продуцирующие карбапенемазы типа KPC и NDM-1.

* Discovery Research Laboratory for Core Therapeutic Areas, Shionogi & Co., Ltd., Toyonaka, Osaka, Japan.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ OP0595, НОВОГО ДИАЗАБИЦИКЛООКТАНА ТРОЙНОГО ДЕЙСТВИЯ, С БЕТА-ЛАКТАМАМИ, НАПРАВЛЕННЫЕ ПРОТИВ МУТАНТОВ ENTEROBACTERIACEAE, УСТОЙЧИВЫХ К OP0595.

INTERACTIONS OF OP0595, A NOVEL TRIPLE-ACTION DIAZABICYCLOOCTANE, WITH β -LACTAMS AGAINST OP0595-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE MUTANTS / D. M. LIVERMORE*, M. WARNER, S. MUSHTAQ, N. WOODFORD// ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JANUARY 2016; 60: 1: 554–560.

Новый представитель диазабициклооктанов OP0595, подобно авибактаму, подавляет бета-лактамазы классов А и С. Но, в отличие от авибактама, OP0595 обладает антибактериальной активностью со значениями МПК 0,5–4 мкг/мл для большинства бактерий семейства Enterobacteriaceae, чувствительных к подавлению ПСБ2, а также синергидно взаимодействует с ПСБ3-активными бета-лактамами, независимо от подавляющего действия на бета-лактамазы, через механизм «усилительного эффекта». На агаровой среде с частотой примерно 10^{-7} были отселекционированы мутанты Enterobacteriaceae со стабильной устойчивостью к 16 мкг/мл OP0595, тем не менее OP0595 продолжал усиливать действие субстратных бета-лактамов на мутанты, полученные из Enterobacteriaceae и продуцирующие бета-лактамазы классов А и С, подавляемые OP0595. Более слабое потенцирование «партнёров» комбинаций, особенно азтреонама, цефепима и пиперациллина, в меньшей степени меропенема, наблюдается часто у OP0595-устойчивых мутантов Enterobacteriaceae, дефицитных по бета-лактамазе или продуцирующих OP0595-устойчивые металло-бета-лактамазы, о чём свидетельствует наличие «усилительного эффекта» даже при отсутствии антибиотической активности.

* Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections Reference Unit, Public Health England, London, United Kingdom.

ОТЛИЧИТЕЛЬНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ АВИБАКТАМА С ПЕНИЦИЛЛИН-СВЯЗЫВАЮЩИМИ БЕЛКАМИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И ГРАМПЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ.

DISTINCTIVE BINDING OF AVIBACTAM TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS OF GRAM-NEGATIVE AND GRAM-POSITIVE BACTERIA / A. ASLI, E. BROUILLETTE, K. M. KRAUSE, W. W. NICHOLS, F. MALOUIN* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY FEBRUARY 2016; 60: 2: 2 752—756.

Авибактам — новый не бета-лактамной природы ингибитор бета-лактамаз, ковалентно ацилирующий различные бета-лактамазы, тем самым подавляющий их действие. При ограниченной антибактериальной активности авибактама была исследована его способность ацилировать бактериальные пенициллин-связывающие белки (ПСБ). Особый интерес представлял *Staphylococcus aureus* из-за сообщений о бета-лактамазной активности ПСБ4. Связывание авибактама с ПСБ измеряли добавлением возрастающих концентраций препаратов мембран различных грам(+) и грам(-) бактерий с последующим добавлением флуоресцирующего реагента Vocillin FL. Относительное связывание (измеренное как 50% ингибиторная концентрация, IC₅₀) с ПСБ измеряли по флуоресценции гелевых электрофореграмм. Было установлено, что авибактам избирательно связывается с некоторыми ПСБ. У *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus* авибактам первоначально связывается с ПСБ2 (значения IC₅₀ 0,92; 1,1; 3,0 и 51 мкг/мл соответственно), у *Streptococcus pneumoniae* наблюдали связывание с ПСБ3 (IC₅₀, 8,1 мкг/мл). Интересно отметить, что авибактам значительно усиливал включение метки Vocillin FL ПСБ4 *S. aureus*. При определении конкуренции между ПСБ *S. aureus* использовали фиксированные концентрации авибактама в комбинации с различными количествами цефтазидима. Величина IC₅₀ цефтазидима при этом была сходна с величиной, определяемой для одного цефтазидима. Итак, авибактам способен ковалентно связываться с некоторыми бактериальными ПСБ. Выявление таких ПСБ-мишеней позволит разработать новые диазабициклооктановые производные с повышенным аффинитетом к ПСБ или новые терапевтические комбинации, действующие на множественные ПСБ-мишени.

* Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie,

Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

АНТИ- *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* АКТИВНОСТЬ 1,10-ФЕНАНТРОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК, РАСТУЩИХ В ВИДЕ ПЛАНКТОНА И БИОПЛЁНКИ.

ANTI-PSEUDOMONAS AERUGINOSA ACTIVITY OF 1,10-PHENANTHROLINE-BASED DRUGS AGAINST BOTH PLANKTONIC- AND BIOFILM-GROWING CELLS / L. VIGANOR, A. C. M. GALDINO, A. P. F. NUNES, K. R. N. SANTOS, M. H. BRANQUINHA, M. DEVEREUX, A. KELLET, M. MCCANN, A. L. S. SANTOS* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 1: 128—134.

Побудительными мотивами данного исследования по оценке действия 1,1-фенантролин (фен)-производных, 1,10-фенантролин-5,6-диона (фендион), [Ag(фендион)₂]ClO₄ и [Cu(фендион)₃](ClO₄)₂ • 4H₂O на планктонные и растущие в виде биоплёнки клетки *Pseudomonas aeruginosa* были антимикробные свойства лекарств на основе 1,10-фенантролина (фен) и насущная потребность в разработке новых терапевтических подходов для профилактики и лечения при инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью (MDR). В экспериментах использовали 32 не дублирующихся бразильских клинических штамма *P. aeruginosa* с различным генетическим базисом. Действие испытуемых соединений на пролиферацию планктонных бактериальных клеток определяли в соответствии с протоколом CLSI. Влияние на образование биоплёнки оценивали по включению кристаллического фиолетового (определение биомассы), и методом ХТТ (оценка жизнеспособности). Разрушение зрелой биоплёнки подтверждали окрашиванием кристаллического фиолетового. Фен-соединения проявляли анти- *P. aeruginosa* активность в различной степени (по геометрическому значению МПК): [Cu(фендион)₃]²⁺ (7.76 μM) > [Ag(фендион)₂]⁺ (14.05 μM) > фендион (31.15 μM) > фен (579.28 μM). МПК каждого соединения не зависела от чувствительности или устойчивости к классическим антибиотикам (цефтазидим, меропенем или имипенем). Предварительная обработка бактерий 0,5 МПК для фен'а, фендиона или производных фендиона с металлами подавляла образование биоплёнки, особенно при использовании [Cu(фендион)₃]²⁺ и [Ag(фендион)₂]⁺, которые значительно снижали биомассу (48 и 44% соответственно) и жизнеспособность (78 и 77% соответственно). Данные соединения также разрушали дозозависимо зрелую биоплёнку, особенно [Ag(фендион)₂]⁺ и [Cu(фен-

дион)₃]²⁺ (IC₅₀, 9,39 и 10,16 μ M соответственно). Соединения фендиона с Ag⁺ и Cu²⁺ представляют новую перспективную группу противомикробных веществ, которые проявили высокую активность против как планктонных, так и растущих в форме биоплёнки клеток *P.aeruginosa*.

* Laboratório de Investigação de Peptidases (LIP), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Bloco E-subsolo, sala 05, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА NLF20 В ОТНОШЕНИИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ИНВАЗИВНОЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

NLF20: AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE WITH THERAPEUTIC POTENTIAL AGAINST INVASIVE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INFECTION / P. PAPAREDDY*, G. KASETTY, M. KALLE, R. K. V. BHONGIR, M. MÖRGELIN, A. SCHMIDTCHEN, M. MALMSTEN // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 1: 170—180.

Растущая устойчивость к антибиотикам повышает интерес к антимикробным пептидам как лекарственным средствам. Было выполнено исследование пептида NLF20 (NLFRKLTHRLFRNFGYTLR), соответствующего эпитопу D спирали гепаринового кофактора II (НСII), плазменного белка, опосредующего клиренс бактерий. Оценивали антибактериальное, противовоспалительное и цитотоксическое действие пептида комбинацией методов *in vitro* и *in vivo*, флуоресцентной и электронной микроскопией на экспериментальной модели эндотоксического шока и *Pseudomonas aeruginosa*-сепсиса. Как показали результаты, NLF20 проявлял сильное антимикробное действие против грам(-) бактерий *Escherichia coli* и *P.aeruginosa*, грам(+) *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, а также грибов *Candida albicans* и *Candida parapsilosis*. Важно, что антимикробное действие сохранялось в крови человека, особенно в отношении *P.aeruginosa*. Флуоресцентное и электронное микроскопирование показало, что пептид обладает мембранно-разрушающим действием. На модели *P.aeruginosa*-сепсиса животных пептид NLF20 снижал уровень бактерий, повышая выживаемость. На экспериментальной животной модели эндотоксического шока также было отмечено понижение показателя смертности, одновременное с модулированием IFN- γ , IL-10 и коагулазного откликов. В итоге, полученные результаты означают, что функциональные эпито-

пы НСII в качестве лекарственных средств могут обладать активностью в отношении бактериальных инфекций.

* Division of Dermatology and Venereology, Department of Clinical Sciences, Lund University, Lund, Sweden.

* Division of Infection Medicine, Department of Clinical Sciences, Lund University, Lund, Sweden.

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ПОДКИСЛЯЕТ БИОПЛЁНКИ И ИНДУЦИРУЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ К АМИНОГЛИКОЗИДАМ У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

EXTRACELLULAR DNA ACIDIFIES BIOFILMS AND INDUCES AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* / M. WILTON, L. CHARRON-MAZENOD, R. MOORE, S. LEWENZA* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JANUARY 2016; 60: 1: 544—553.

Биоплёнки состоят из поверхностно расположенных бактериальных сообществ, заключённых во внеклеточную матрицу, содержащую ДНК, экзополисахариды и белки. Внеклеточная ДНК (eDNA) играет структурообразующую роль в формировании биоплёнки и может связывать и защищать биоплёнки от действия аминогликозидов, а также индуцировать механизмы устойчивости к антимикробным пептидам. Приведены доказательства того, что eDNA ответственна за подкисление планктонной культуры и биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa*. Кроме того, было показано, что кислые значения pH и подкисление с помощью eDNA является сигналом для *P.aeruginosa* к индукции экспрессии генов, регулируемых двухкомпонентными регуляторными системами PhoPQ и PmrAB. Планктонная культура *P.aeruginosa*, выросшая в присутствии 0,2% экзогенной ДНК или в кислых условиях среды демонстрировала 2—8-кратное увеличение устойчивости к аминогликозидам. Такой фенотип устойчивости формируется в результате модификации аминоарабинозы липида А и образования спермидина на наружной бактериальной мембране, что снижает проникновение аминогликозидов внутрь клетки. Добавление щелочной аминокислоты L-аргинина и бикарбоната натрия нейтрализует pH и сохраняет чувствительность *P.aeruginosa* к аминогликозидам, даже в присутствии eDNA. Полученные данные показывают, что аккумуляция eDNA в биоплёнках и местах инфицирования может локально закислять среду, а кислые значения pH провоцируют формирование антибиотикоустойчивого фенотипа *P.aeruginosa*.

* Department of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, Snyder Institute of Chronic Diseases, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

КОМБИНИРОВАННАЯ АНТИБИОТИКОТЕРАПИЯ МОЖЕТ СЕЛЕКЦИОНИРОВАТЬ МНОЖЕСТВЕННУЮ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ ШИРОКОГО СПЕКТРА У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

ANTIBIOTIC COMBINATION THERAPY CAN SELECT FOR BROAD-SPECTRUM MULTIDRUG RESISTANCE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* / M. VESTERGAARD, W. PAULANDER, R.L. MARVIG, J. CLASEN, N. JOCHUMSEN, S. MOLIN, L. JELSBAG, H. INGMER, A. FOLKESSON* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2016; 47: 1: 48–55.

Применение комбинированной терапии из нескольких антибиотиков представляет стратегический приём, сдерживающий развитие антибиотикоустойчивости. Сравнивали развившуюся *de novo* устойчивость в процессе комбинированной терапии бета-лактамом цефтазидимом и фторхинолоновым антибиотиком цiproфлоксацином с устойчивостью после экспозиции с одним антибиотиком. Комбинированная терапия селекционировала мутанты, проявляющие устойчивость широкого спектра, основным механизмом которой была мутационная инактивация репрессора гена *mexR*, который регулирует оперон множественного выброса *mexAB—oprM*. Нарушение регуляции оперона приводит к развитию фенотипа с широким спектром устойчивости со сниженной чувствительностью к комбинации лекарств, используемых в процессе селекции, так и к антибиотикам неродственных классов. Мутанты, выделенные после экспозиции с одним антибиотиком, имели узкий спектр устойчивости и содержали мутации в регуляторном гене *nfxB* помпового выброса MexCD—OprJ, обеспечивающие устойчивость к цiproфлоксацину, или в гене, кодирующем несущественный пенициллин-связывающий белок DacB, обеспечивающий устойчивость к цефтазидиму. Реконструкция мутаций устойчивости с помощью аллельных замещений и определения фитнесса *in vitro* показали, что в противоположность действию одного антибиотика комбинированная терапия селекционирует мутанты с усиленным фитнессом, экспрессирующие механизмы устойчивости широкого спектра.

* National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark.

АНТИПСЕВДОМОНАДНЫЙ БАКТЕРИОФАГ СНИЖАЕТ ИНФЕКЦИОННУЮ НАГРУЗКУ И ВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ РЕАКЦИЮ В ЛЁГКИХ МЫШЕЙ.

ANTIPSEUDOMONAL BACTERIOPHAGE REDUCES INFECTIVE BURDEN AND INFLAMMATORY RESPONSE IN MURINE LUNG / R. PABARY, C. SINGH, S. MORALES, A. BUSH, K. ALSHAFI, D. BILTON, E W. F. W. ALTON, A. SMITHYMAN, J. C. DAVIES* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY FEBRUARY 2016; 60: 2: 2 744–751.

В связи с ростом устойчивости к антибиотикам назревает потребность в новых способах преодоления инфекции, в частности при муковисцидозе, когда распространённый патоген *Pseudomonas aeruginosa* ассоциируется с высокими показателями заболеваемости и смертности. Бактериофаги представляют успешную альтернативную терапию, поскольку специфичны в отношении бактериальных мишеней, и побочные явления при их применении не зарегистрированы. Была проверена *in vitro* эффективность фагового «коктейля». Для модельной острой инфекции у мышей были выбраны два штамма *P. aeruginosa*, введение бактериофага было профилактическим, одновременным с инфицированием и постинфекционным. Инфекционную нагрузку и воспалительный процесс в бронхоальвеолярной жидкости (БАЖ) оценивали через определённые промежутки времени. При низких инфицирующих дозах контрольные мыши и подвергшиеся одновременной с инфицированием фаговой обработке на 48 ч излечивались от *P. aeruginosa*, но у мышей, леченных фагом было ниже число нейтрофилов в БАЖ (медиана, $73,2 \times 10^4/\text{мл}$ [пределы, $35,2—102,1 \times 10^4/\text{мл}$] против $174 \times 10^4/\text{мл}$ [$112,1—266,8 \times 10^4/\text{мл}$], $p < 0.01$ для клинического штамма; медиана, $122,1 \times 10^4/\text{мл}$ [$105,4—187,4 \times 10^4/\text{мл}$] против $206 \times 10^4/\text{мл}$ [$160,1—331,6 \times 10^4/\text{мл}$], $p < 0.01$ для PAO1). При более высоких инфицирующих дозах PAO1 все леченные фагом мыши излечивались от *P. aeruginosa* инфекции на 24 ч, тогда как у контрольных мышей инфекция персистировала (медиана, 1305 CFU/мл [пределы, 190–4700 CFU/мл], $p < 0.01$). Бактериофаг также снижал бактериальную нагрузку при постинфекционном введении (24 ч), а также показатели КОЕ/мл и воспаления в БАЖ при профилактическом введении. Было показано также снижение уровня воспалительных растворимых цитокинов в БАЖ при разных условиях. Итак, бактериофаги эффективно снижали бактериальную нагрузку и воспалительный процесс при лёгочной *P. aeruginosa* инфекции у мышей. Настоящее исследование является обоснованием для будущих клинических исследований на больных муковисцидозом.

* National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London, United Kingdom

* Department of Paediatric Respiratory Medicine, Royal Brompton Hospital, London, United Kingdom.

**ПОИСКИ НОВЫХ СТРАТЕГИЙ БОРЬБЫ
С ИНФЕКЦИЯМИ В ФОРМЕ ПОЛИМИКРОБНЫХ
БИОПЛЁНОК: ГУАНИЛИРОВАННЫЕ
ПОЛИМЕТАКРИЛАТЫ УНИЧТОЖАЮТ СМЕШАННЫЕ
ГРИБКОВО-БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЁНКИ.**

**SEARCHING FOR NEW STRATEGIES AGAINST
POLYMICROBIAL BIOFILM INFECTIONS: GUANYLATED
POLYMETHACRYLATES KILL MIXED FUNGAL/
BACTERIAL BIOFILMS /Y. QU, K. LOCOCK,
J. VERMA-GAUR, I. D. HAY, L. MEAGHER,
A. TRAVEN* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL
CHEMOTHERAPY 2016; 71: 2: 413–421.**

Инфекции у человека, ассоциированные с образованием биоплёнок, имеют высокий показатель смертности из-за устойчивости к лекарствам. Существование различных микробов в полимикробных биоплёнках (ПмБ) является обычным явлением, и это создают дополнительные проблемы при лечении по сравнению с мономикробными биоплёнками. Оценивали возможности нового класса антимикробных соединений, гуанилированных полиметакрилатов (ГПМК), в отношении ПмБ, состоящих из двух известных патогенов человека: грибка *Candida albicans* и бактерии *Staphylococcus aureus*. Противоплёночную эффективность нового класса соединений, структурно подобных антимикробным пептидам, оценивали визуально и количественными методами и далее сравнивали с комбинированной терапией антистафилококковыми и анти-*Candida* препаратами первой линии, используемыми против ПмБ. ГПМК в качестве монопрепарата очень эффективно убивали клетки *C. albicans* и *S. aureus* в ПмБ предопределённого состава. Более того, применение комбинации одного из испытуемых ГПМК соединений с обычно используемыми антимикробными препаратами вызывало 99,98% *S. aureus* и 82,2% *C. albicans* гибель при концентрации 128 мг/л. Из-за защитной функции внеклеточной матрицы биоплёнки МПК ГПМК была в 2–4 раза выше, чем для планктонных клеток. Использование в экспериментах мутанта *C. albicans* *bgl2ΔΔ* позволило выявить роль матричного полисахарида β -1,3 глюкана в механизме защиты. Действие этого механизма может быть сведено к минимуму за счёт оптимизации структуры полимера, о чём свидетельствуют данные опытов с двумя полимерами различной структуры. И, наконец, было показано возможное применение указанных полимеров в качестве антимикробной

лок-терапии. Таким образом, ГПМК представляют перспективное направление при разработке эффективной монотерапии при полимикробных *C. albicans*/*S. aureus* биоплёнках.

* Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Nursing and Health Science, Monash University, Clayton, VIC 3800, Australia.

**ВЛИЯНИЕ СИГНАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ *CANDIDA*
ALBICANS, ПЕРЕКРЁСТНО ДЕЙСТВУЮЩЕЙ
НА МИКРООРГАНИЗМЫ РАЗНЫХ
СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП («ЦАРСТВ»),
НА ФИЗИОЛОГИЮ *ACINETOBACTER BAUMANNII*.**

**IMPACT OF A CROSS-KINGDOM SIGNALING MOLECULE
OF *CANDIDA ALBICANS* ON *ACINETOBACTER*
BAUMANNII PHYSIOLOGY /X. KOSTOULIAS,
G. L. MURRAY, G. M. CERQUEIRA*, J. B. KONG,
F. BANTUN, E. MYLONAKIS, C. AI KHOO*,
A. Y. PELEG* // ANTIMICROBIAL AGENTS
CHEMOTHERAPY JANUARY 2016; 60: 1: 161–167.**

Acinetobacter baumannii с множественной лекарственной устойчивостью (MDR) — оппортунистический патоген человека, создающий серьёзные проблемы в условиях клиники. Это безотлагательно требует новых подходов в терапии. Облегчить поиск решений может исследование антагонистических взаимоотношений между *A. baumannii* и наиболее распространённым грибковым патогеном человека *Candida albicans*. Было замечено, что фарнезол, сигнальная молекула кворум-сенсинга *C. albicans*, перекрёстно взаимодействует с микроорганизмами, относящимися к разным систематическим группам, и оказывает влияние на жизнеспособность *A. baumannii*. Для выяснения данного механизма был исследован транскрипционный профиль *A. baumannii* после экспозиции с фарнезолом. Фарнезол нарушал регуляцию большого числа генов, участвующих в биогенезе клеточной мембраны, мультилекарственных насосов выброса (AcrAB-like и AdeIJK-like) и проявлениях вирулентности, как-то образование биоплёнки (*csuA*, *csuB* и *ompA*) и подвижность (*pilZ* и *pilH*). Также наблюдали сильную индукцию генов, играющих роль в делении клеток (*minD*, *minE*, *ftsK*, *ftsB* и *ftsL*). Данные транскрипционного анализа были подтверждены при функциональных исследованиях, показавших нарушение фарнезолом целостности клеточной мембраны *A. baumannii*, морфологии клеток, ухудшение таких вирулентных характеристик, как образование биоплёнки и подвижность в форме подёргиваний. Было показано, что *A. baumannii* использует насосы выброса в качестве защитного механизма от эукариотной

сигнальной молекулы. Основываясь на дезинтегрирующем действии фарнезола на клеточную мембрану *A.baumannii*, проверили его способность усиливать активность колистина в отношении мембраны. При совместном введении фарнезол повышал чувствительность к колистину, за исключением устойчивых штаммов. Полученные результаты дают представление об антагонистических взаимоотношениях между различными патогенами и могут открыть новые терапевтические подходы.

* Department of Microbiology, Monash University, Melbourne, Australia.

IN VITRO И IN VIVO АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО СОРАФЕНИБА SC5005 В ОТНОШЕНИИ MRSA.

IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITY OF A NOVEL SORAFENIB DERIVATIVE SC5005 AGAINST MRSA / H.-C. CHANG, Y.-T. HUANG, C.-S. CHEN, Y.-W. CHEN, Y.-T. HUANG, J.-C. SU, L.-J. TENG, C.-W. SHIAU, H.-C. CHIU* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 2: 449—459.

Появление MRSA штаммов, устойчивых к большинству антибиотиков, представляет серьёзную угрозу здравоохранению. Открытие подавляющего действия на *Staphylococcus species* ингибитора тирозинкиназы сорафениба стало основанием для изучения его уникальной антибактериальной активности и разработки новых препаратов против MRSA. На основе сорафениба была синтезирована серия соединений путём замещения пиридинильных и фенильных групп другими функциональными группами. Полученные производные были проверены на способность подавлять рост *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* по методике CLSI, а также на цитотоксичность в отношении клеток человека определением жизнеспособности МТТ способом. Соединения, избирательность подавления бактерий которых превосходила токсичность, далее были оценены методом «time-kill» и по выживаемости *Caenorhabditis elegans* и мышей для определения их *in vitro* и *in vivo* эффективности. Скрининг соединений позволил идентифицировать SC5005, обладающего высокой бактерицидной активностью в отношении различных клинических штаммов MRSA, значением МПК₉₀ 0,5 мг/л и низкой токсичностью, согласно отношению IC₅₀/МПК, равному 40. Кроме того, SC5005 обладал защитным действием в отношении MSSA- или MRSA-инфицированной *C.elegans*. При внутрибрюшинном введении 10 мг/кг SC5005 значительно повыша-

лась выживаемость MRSA-инфицированных C57BL/6 мышей. В свете высокой MRSA- подавляющей активности на моделях *in vitro* и *in vivo* SC5005 представляется весьма перспективным для продолжения доклинических исследований в качестве анти-MRSA средства.

* Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

ОЦЕНКА ТЕДИЗОЛИДА В ОТНОШЕНИИ STAPHYLOCOCCUS AUREUS И ЭНТЕРОКОККОВ С ПОНИЖЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ВАНКОМИЦИНУ, ДАПТОМИЦИНУ И ЛИНЕЗОЛИДУ.

EVALUATION OF TEDIZOLID AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND ENTEROCOCCI WITH REDUCED SUSCEPTIBILITY TO VANCOMYCIN, DAPTOMYCIN OR LINEZOLID / K. E. BARBER, J. R. SMITH, A. RAUT, M. J. RYBAK* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 1: 152—155.

Тедизолид проявляет высокую активность в отношении грамположительных патогенов. *In vitro* исследования с клиническими штаммами *Staphylococcus aureus* и энтерококков показали повышенную активность тедизолида по сравнению с линезолидом, но отсутствуют данные о его активности в отношении большой коллекции устойчивых штаммов *S.aureus*, включая штаммы с промежуточной (VISA), и гетерогенной (hVISA) устойчивостью к ванкомицину, не чувствительных к даптомицину (DNS), устойчивых к линезолиду (LR) и энтерококков, устойчивых к ванкомицину (VRE). Задачей исследования было определить сравнительную активность тедизолида и других антибиотиков в отношении MRSA и VRE с различными фенотипами устойчивости. Всего было оценено 302 штамма MRSA (75 DNS, 100 VISA, 120 hVISA и 7 LR) и 220 VRE, из них 100 *Enterococcus faecalis* (все чувствительны к даптомицину и линезолиду и 120 *E.faecium* (25 DNS и 10 LR). Штаммы LR были проанализированы на наличие гена *cfr*. МПК тедизолида, линезолида, ампициллина, клиндамицина, даптомицина, гентамицина, левофлоксацина, оксациллина, тигециклина, триметоприма/сульфаметоксазола и ванкомицина были определены в соответствии с руководством CLSI. Значения МПК₉₀ тедизолида у hVISA, VISA и DNS штаммов составили 0,5 мг/л (против 4, 4 и 2 мг/л линезолида соответственно), у LR MRSA были в пределах 0,063—1 мг/л. Два штамма LR MRSA содержали *cfr* ген при значениях МПК тедизолида 0,125 и 0,25 мг/л (МПК линезолида 16 и 8 мг/л). МПК тедизолида

устойчивых к ванкомицину *E.faecalis* и *E.faecium* были равны 0,25 и 1 мг/л соответственно; т.е. с разницей в 3 разведения у *E.faecalis* и 2 разведения у *E.faecium* по сравнению с линезолидом. Таким образом, тедизолид, согласно значениям МПК, проявил активность в отношении штаммов с пониженной чувствительностью к альтернативным антибиотикам, включая линезолид, и может быть полноценным антибиотиком выбора в клинических ситуациях с MDR грамположительными патогенами.

* Anti-Infective Research Laboratory, Eugene Applebaum College of Pharmacy and Health Sciences, Detroit, MI, USA.

**ПЕРСПЕКТИВЫ НОВОГО АНТИСТАФИЛОКОККОВОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА БАТУМИНА,
ВЫЯВЛЕННОГО МОЛЕКУЛЯРНЫМ СВЯЗЫВАНИЕМ
И АНАЛИЗОМ ПОЛНОЙ ГЕНОМНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРОДУЦЕНТА БАТУМИНА
PSEUDOMONAS BATUMICI UCM B-321.**

**PROSPECTS OF A NEW ANTISTAPHYLOCOCCAL DRUG
BATUMIN REVEALED BY MOLECULAR DOCKING
AND ANALYSIS OF THE COMPLETE GENOME SEQUENCE
OF THE BATUMIN-PRODUCER *PSEUDOMONAS
BATUMICI* UCM B-321/V. V. KLOCHKO, L. B. ZELENIA,
J. Y. KIM, L. V. AVDEEVA, O. N. REVA*//
INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL
AGENTS 2016; 47: 1: 56—61.**

Метициллиноустойчивый *Staphylococcus aureus* (MRSA) вызывает вспышки инфекций в клиниках всего мира, представляя угрозу здравоохранению.

Мупироцин является перспективным анти-MRSA лекарственным препаратом, но устойчивые к нему штаммы *S.aureus* проявляются с возрастающей скоростью. Недавно открытый новый антибиотик батумин может внести вклад в анти-MRSA терапию. Задачей исследования было определить возможные молекулярные мишени батумина и механизмы антистафилококковой активности, применяя моделирование молекулярного связывания и полное геномное секвенирование продуцента батумина *Pseudomonas batumici* UCM B-321. Было установлено, что батумин действует сходным образом с мупироцином, подавляя аминоацил тРНК синтетазу. Первоначальная гипотеза о транс-эноил-КоА редуктазе как первичной молекулярной мишени батумина была отклонена. Однако у чувствительных бактерий наблюдается не прямое подавление биосинтеза жирных кислот как часть неременной ответной репрессии, спровоцированной аккумуляцией незаряженных молекул тРНК. Паралог различных лейцин-тРНК синтетаз в геноме *P.batumici* означает, что этот белок может быть главной мишенью батумина. Показано, что оперон биосинтеза батумина, содержащий 28 генов был приобретён в результате горизонтального переноса. Предполагается, что в отличие от мупироцина батумин может подавлять широкий круг аминоацил тРНК синтетаз, а приобретаемая устойчивость к мупироцину может не обеспечивать штаммам *S.aureus* устойчивость к батумину.

* Centre for Bioinformatics and Computational Biology, Department of Biochemistry, University of Pretoria, South Africa.

Подготовлено Н. С. Бондаревой (Москва)

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

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

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

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

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

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

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

6. Таблицы должны быть пронумерованы, иметь название, заголовки граф точно соответствовать их содержанию, а цифры в таблицах — цифрам в тексте.

Неообщепринятые сокращения в графах не допускаются. На каждую таблицу в тексте статьи должны быть **сноски**.

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

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

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

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

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

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

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

фии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, год, количество страниц.

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

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

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

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

Инъекционная эффективность в таблетках*

при респираторных
инфекциях



№1 в назначениях
антибиотиков¹

Вильпрафен® Солютаб®

джозамицин

Эффективный в отношении штаммов,
резистентных к кларитромицину
и азитромицину^{2,3}

Самый активный из макролидов
в отношении стрептококков⁴



* Яковлев С. В., Довгань Е. В. Аспекты эффективности антибиотиков. Справочник поликлинического врача. №6, 2014 г., стр. 4–6.

1. Препараты компании Астеллас занимают первое место по назначениям врачами антибиотиков в крупнейших городах России.

Настоящая информация основана на исследованиях, проводимых ООО «Синовейт Комкон», и действительна по состоянию на апрель 2015 года.

2. Сидоренко С. В. и соавт. Клиническая фармакология и терапия, 2008, 2: 28–32.

3. Адаптировано, Азовскова О. В., Козлов Р. С., Кречикова О. И., Иванчик Н. В. КМАХ, 2012, Том 14, №4, стр. 309–321

4. Адаптировано, Козлов Р. С., Сивая О. В. и соавт. Динамика резистентности *S. pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999–2009 гг. (результаты многоцентрового проспективного исследования PeIAC), КМАХ, 2010, Том 12, №4, стр. 329–341.

Информация для специалистов здравоохранения

АО «Астеллас Фарма», 109147, Москва, ул. Марксистская, д. 16. Тел. +7(495) 737-07-56.

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. ПЕРЕД НАЗНАЧЕНИЕМ ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ

Сделайте шаг к защите от пневмококковой инфекции



Превенар 13

Вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная, тринадцативалентная

Первая и единственная пневмококковая
конъюгированная вакцина для детей*
и взрослых

* от 2 месяцев

Краткая инструкция по применению лекарственного препарата ПРЕВЕНАР® 13 (вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная, тринадцативалентная)

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА:

Вакцина Превенар® 13 представляет собой капсулярные полисахариды 13-ти серотипов пневмококка: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, индивидуально конъюгированные с дифтерийным белком CRM₁₉₇, и адсорбированные на алюминии фосфате.

ОПИСАНИЕ:

Гомогенная суспензия белого цвета.

НАЗНАЧЕНИЕ: Профилактика пневмококковых заболеваний, включая инвазивные инфекции (в том числе менингит, бактериемия, сепсис), пневмонии и средние отиты, вызываемых *Streptococcus pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F с 2-х месяцев жизни.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

- Повышенная чувствительность на предшествующее введение Превенар® 13 или Превенар® (в том числе, анафилактический шок, тяжелые генерализованные аллергические реакции);
- Повышенная чувствительность к дифтерийному анатоксину и/или вспомогательным веществам;
- Острые инфекционные или неинфекционные заболевания, обострения хронических заболеваний. Вакцинацию проводят после выздоровления или в период ремиссии.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ

Способ введения

Вакцину вводят в разовой дозе 0,5 мл внутримышечно. Детям первых лет жизни прививки проводят в верхне-наружную поверхность средней трети бедра, лицам старше 2-х лет – в дельтовидную мышцу плеча.

Перед применением шприц с вакциной Превенар® 13 необходимо хорошо встряхнуть до получения гомогенной суспензии. Не использовать, если при осмотре содержимого шприца выявляются инородные частицы, или содержимое выглядит иначе, чем в разделе «Описание» настоящей инструкции.

Не вводить Превенар® 13 внутрисосудисто и внутримышечно в ягодичную область!

Если начата вакцинация Превенар® 13, рекомендуется завершить ее также вакциной Превенар® 13. При вынужденном увеличении интервала между инъекциями любого из приведенных выше курсов вакцинации, введение дополнительных доз Превенар® 13 не требуется.

Схема вакцинации

Возраст начала вакцинации	Схема вакцинации	Интервалы и дозировка
2 мес-6 мес	3+1 или 2+1	Индивидуальная иммунизация: 3 дозы с интервалом не менее 4 нед между введениями. Первую дозу можно вводить с 2-х мес. Ревакцинация однократно в 11-15 мес. Массовая иммунизация детей: 2 дозы с интервалом не менее 8 нед между введениями. Ревакцинация однократно в 11-15 мес.
7-11 мес	2+1	2 дозы с интервалом не менее 4 нед между введениями. Ревакцинация однократно на втором году жизни
12-23 мес	1+1	2 дозы с интервалом не менее 8 нед между введениями
2 года и старше	1	Однократно

Дети, ранее вакцинированные Превенар®

Вакцинация против пневмококковой инфекции, начатая 7-валентной вакциной Превенар®, может быть продолжена Превенар® 13 на любом этапе схемы иммунизации.

Лица в возрасте 18 лет и старше

Превенар® 13 вводится однократно. Необходимость ревакцинации Превенар® 13 не установлена. Решение об интервале между введением вакцин Превенар® 13 и ППВ23 следует принимать в соответствии с официальными методическими рекомендациями.

Особые группы пациентов

У пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток рекомендуется серия иммунизации, состоящая из 4 доз препарата Превенар® 13 по 0,5 мл. Первая серия иммунизации состоит из введения трех доз препарата: первая доза вводится с третьего по шестой месяц после трансплантации. Интервал между введениями должен составлять 1 месяц. Ревакцинирующую дозу рекомендуется вводить через 6 месяцев после введения третьей дозы.

Недоношенным детям рекомендуется четырехкратная вакцинация. Первая серия иммунизации состоит из 3-х доз. Первую дозу следует вводить в возрасте 2 месяца независимо от массы тела ребенка с интервалом 1 месяц между дозами. Введение четвертой (бустерной) дозы рекомендуется в возрасте 12-15 месяцев.

Пожилые пациенты

Иммуногенность и безопасность вакцины Превенар® 13 были подтверждены для пожилых пациентов.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

При температуре от 2 до 8° С. Не замораживать. Хранить в недоступном для детей месте.

СРОК ГОДНОСТИ

3 года. Не использовать после истечения срока годности, указанного на упаковке.

Пretензии потребителей направлять по адресу:

- Представительство корпорации Пфайзер Эйч. Си. Пи. Корпорэйшн, 123317 Москва, Пресненская наб., д. 10, БЦ «Башня на Набережной» (Блок С)
Тел.: (495) 287-5000, факс: (495) 287-5300
- ООО «НПО Петровас Фарм», Российская Федерация, 142143, Московская область, Подольский район, с. Покров, ул. Сосновая, д. 1
Тел./факс: (495) 926-2107, e-mail: info@petrovax.ru
- Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор): 109074, Москва, Славянская пл. д. 4, стр. 1
Тел.: (495) 698-4538; (499) 578-0230