

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 65



1-2'2020

Научно-практический журнал

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

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

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

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

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

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

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

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2019

Типография:

ООО «Литера»

Дата выхода: 2020

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 65

1—2'2020

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

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

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

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Научные редакторы

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Оригинальные статьи

Original Papers

- Гулий О. И., Зайцев Б. Д., Смирнов А. В., Каравая О. А.,
Алсоев А. К. М., Ларионова О. С., Бородин И. А.
Микробный датчик для определения
активности амоксициллина
Гаврюшина И. А., Громовых Т. И.,
Фельдман Н. Б., Луценко С. В.,
Пономаренко В. И., Кисиль О. В., Садыкова В. С.
Антимикробные свойства водорастворимых
полисахаридов и спиртовых экстрактов мицелия *Laetiporus
sulphureus* (bull.) Murrill и разработка биотехнологии
его получения в иммобилизованной культуре
на бактериальной целлюлозе
Зарубаев В. В., Гаршинина А. В., Слита А. В.,
Беляевская С. В., Лаврентьева И. Н.
Протективная активность Кагоцела на модели
экспериментальной летальной гриппозной инфекции
Логинова С. Я., Шукина В. Н., Борисевич С. В.,
Хамитов Р. А., Максимов В. А.
Изучение эффективности Рибавирина®
при экспериментальной форме тяжёлого острого
респираторного синдрома

- 3 Guliy O. I., Zaitsev B. D., Smirnov A. V., Karavaeva O. A.,
Alsowaidi A. K. M., Larionova O. S., Borodina I. A.
Microbial Sensor for Determination
of Amoxicillin Activity
10 Gavryushina I. A., Gromovykh T. I.,
Feldman N. B., Lutsenko S. V.,
Ponomarenko V. I., Kisil O. V., Sadykova V. S.
Antimicrobial Properties of Water-Soluble Polysaccharides
and Alcoholic Extracts of *Laetiporus Sulphureus* (Bull.)
Murrill Mycelium and Development of Biotechnology
for Its Production in Immobilized Culture
on Bacterial Cellulose
15 Zarubaev V. V., Garshinina A. V., Slita A. V.,
Belyaevskaya S. V., Lavrentieva I. N.
Protective Activity of Kagocel® on the Model
of Experimental Lethal Influenza Infection
21 Loginova S. Ya., Shchukina V. N., Borisevich S. V.,
Hamitov R. A., Maksimov V. A.
Studying The Effectiveness of Ribavirin®
in The Experimental Form of Severe
Acute Respiratory Syndrome

В помощь практикующему врачу

Guidelines for Practitioners

- Маркелова Н. Н., Тутельян А. В., Седых Н. Г.
Формирование персистеров у клинических изолятов
K.pneumoniae, индуцированных меропенемом,
амикацином и их комбинацией
Кучмезова Ф. А., Шабатукова М. Я., Арамисова Р. М.,
Камбачокова З. А., Борукаева И. Х., Чочаева М. Ж.,
Габеева М. М., Сабанчиева Х. А.
Региональные особенности течения пневмоний
на современном этапе
Маджидова Я. Н., Халилова А. Э.
Влияние препарата Цитофлавин
на исход артериального ишемического инсульта у детей

- 27 Markelova N. N., Tutelyan A. V., Sedykh N. G.
Formation of Persisters in Clinical Isolates
of *K.pneumoniae* Induced with Meropenem,
Amikacin, and Their Combination
33 Kuchmezova F. A., Shabatukova M. Ya., Aramisova R. M.,
Kambachokova Z. A., Borukaeva I. Kh., Chochaeva M. Zh.,
Gabaeva M. M., Sabanchieva H. A.
Regional Features of the Course of Pneumonia
at the Present Stage
38 Majidova Ya. N., Khalilova A. E.
The Effect of Cytoflavin on the Outcome
of Ischemic Stroke in Children

Обзоры

Reviews

- Беседнова Н. Н., Кузнецова Т. А.,
Запорожец Т. С., Крыжановский С. П.,
Гажга А. К., Добряков Е. Ю., Звягинцева Т. Н.
Воздействие полисахаридов из морских водорослей
на патогенетические мишени *Helicobacter pylori* —
новое направление в терапии
и профилактике хеликобактерной инфекции
Багирова А. А., Гусейнова И. М.,
Гафар-заде М. Ф., Касумов Х. М.
Ингибирующий эффект макролидных полиеновых
антибиотиков на репродукцию вирусов
Белов Б. С., Тарасова Г. М., Муравьева Н. В.
Вакцинация в ревматологии: новые данные
(по материалам рекомендаций
Европейской антиревматической лиги — EULAR)

- 44 Besednova N. N., Kuznetsova T. A.,
Zaporozhets T. S., Kryzhanovsky S. P.,
Gazha A. K., Dobryakov E. Yu., Zvyagintseva T. N.
The Influence of Polysaccharides From Sea Algae
on The Pathogenetic Targets of *Helicobacter pylori* —
a New Direction In Therapy
and Prevention of Infection
54 Bagirova A. A., Guseynova I. M.,
Gafar-zade M. F., Kasumov H. M.
Inhibiting Effect of Macrolide Polyene Antibiotics
on Reproduction of Viruses
61 Belov B. S., Tarasova G. M., Muravyova N. V.
Vaccination in Rheumatology: New Data
(Based on Recommendations of
the European League Against Rheumatism)

* 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.

Микробный датчик для определения активности амоксициллина

*О. И. ГУЛИЙ^{1,2}, Б. Д. ЗАЙЦЕВ³, А. В. СМЕРНОВ⁴, О. А. КАРАВАЕВА¹,
А. К. М. АЛСОВЭЙДИ⁵, О. С. ЛАРИОНОВА², И. А. БОРОДИНА³

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

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

³ Институт Радиотехники и Электроники им. В.А. Котельникова РАН, Саратовский филиал, Саратов

⁴ Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Москва

⁵ Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов

Microbial Sensor for Determination of Amoxicillin Activity

*O. I. GULIY^{1,2}, B. D. ZAITSEV³, A. V. SMIRNOV⁴, O. A. KARAVAEVA¹, A. K. M. ALSOWAIDI⁵, O. S. LARIONOVA², I. A. BORODINA³

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, Saratov

² Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov

³ Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, RAS, Saratov Branch, Saratov

⁴ Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, RAS, Moscow

⁵ Saratov State University, Saratov

Разработан датчик на основе электродинамического сверхвысокочастотного (СВЧ) резонатора для определения антибактериальной активности антибиотиков на примере амоксициллина. В качестве чувствительного элемента датчика использовали микробные клетки, иммобилизованные на поверхности плёнки полистирола. Определены оптимальные условия иммобилизации микробных клеток *Escherichia coli* XI-1 на поверхности тонкой плёнки полистирола, модифицированной в плазме высокочастотного разряда аргона и нанесённой на пластину ниобата лития. Исследовано влияние амоксициллина на иммобилизованные микробные клетки с помощью СВЧ резонатора. Установлено, что воздействие амоксициллина (от 5 до 50 мкг/мл) приводит к существенному изменению коэффициента отражения S11 на резонансной частоте от пластины ниобата лития в интервале от -12,6 дБ до -15,1 дБ. Показано, что с помощью микробного датчика на основе электродинамического СВЧ резонатора можно определять антибактериальную активность препаратов в исследуемом диапазоне концентраций при времени анализа 15 мин.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, амоксициллин, иммобилизация, тонкие плёнки, полистирол, микробный сенсор, коэффициент отражения, антибактериальная активность.

A sensor based on the electrodynamic microwave resonator has been developed to determine the antibacterial activity of antibiotics using amoxicillin as an example. Microbial cells immobilized on the polystyrene film surface were used as a sensitive element of the sensor. The optimal conditions for the immobilization of *Escherichia coli* XI-1 microbial cells on the surface of a thin polystyrene film modified in high-frequency argon discharge plasma and deposited on a lithium niobate plate were determined. The effect of amoxicillin on immobilized microbial cells was studied using the developed sensor. It has been established that the increase in concentration of amoxicillin from 5 to 50 µg/ml leads to a significant change in the reflection coefficient S11 at the resonance frequency from the lithium niobate plate in the range of -12.6 dB — -15.1 dB. It has been shown that the developed sensor allows determining the antibacterial activity of drugs in the studied concentration range with an analysis time of 15 min.

Keywords: *Escherichia coli*, amoxicillin, immobilization, thin films, polystyrene, microbial sensor, reflection coefficient, antibacterial activity.

Введение

Антибиотики активно используются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности при консервировании и для обработки пищевых продуктов при транспортировке. Одним из основных моментов при использовании антибиотиков является сохранение их стабильности и антибактериальной активности. Существует два метода определения стабильности антибиотиков: классический метод и метод «ускоренного старения». В рамках первого метода лекарственное средство в течение срока годности хранят с со-

блюдением требуемых условий и анализируют активность каждые полгода или каждый год в зависимости от срока годности. Затем дают заключение об оптимальном сроке хранения. Однако это длительный метод. Метод «ускоренного старения» позволяет за 15 дней — 6 мес. при температуре 40–70°C установить срок годности лекарственного средства. Этот метод основан на изучении кинетики реакций разложения лекарственных веществ. Определение ведут в климатических шкафах, автоматически создающих заданные условия хранения: температуру, влажность, свет. Исследуя физические и химические изменения вещества, оценивают его стабильность.

Довольно часто на практике необходимо получить сведения об активности препарата в краткие сроки и во внелабораторных условиях. Поэто-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 410049 Саратов, пр. Энтузиастов, 13. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. E-mail: guliy_olga@mail.ru

му актуальным является развитие методов для экспресс-анализа активности препарата, в том числе, в процессе его хранения. В этом направлении биосенсорные методы, позволяющие получить результат в течение короткого времени, представляются перспективными. Возможность комбинирования биочувствительных элементов с различными преобразователями создает огромное разнообразие сенсоров. Иммунизация чувствительного элемента является одним из этапов при создании биосенсоров. Например, в работе [1] описан процесс подготовки стабильных тонких плёнок SiO_2 и процесс иммобилизации тромбин-связывающего аптамера (ТВА29 против тромбина) и IgG-антител на их поверхности для диагностики концентраций тромбина (от 4 до 270 нМ) с помощью гравиметрического сенсора.

Возможности акустических датчиков с поверхностной акустической волной продемонстрированы в работе [2] для определения уровня *d*-серина с использованием инактивированной формы *d*-сериндегидратазы, иммобилизованной на покрытой плёнкой золота поверхности датчика. Процесс связывания между «инактивированной» *d*-сериндегидратазой и *d*-серином контролировали путём анализа выходных параметров акустической линии задержки.

В работе [3] изучены условия получения распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора на основе многостенных углеродных нанотрубок (УНТ) для высокочувствительного определения фторхинолонов в прямом и конкурентном форматах иммуноанализа.

В работе [4] разработана методика фотохимического синтеза тонких плёнок для определения цефалоспоринов, включающая иммобилизацию антибиотиков на модифицированную γ -аминопропилтриэтоксисиланом поверхность электрода пьезоэлектрического сенсора и последующее дозирование неводного раствора метакриловой кислоты, этиленгликольдиметакрилата и 2.2-азобис(изобутиролнитрила) на подготовленную поверхность сенсора. Установлены диапазоны определяемых концентраций антибиотиков (1–26 мкг/см³ для цефтазидима, 1–31 мкг/см³ для цефтриаксона и 1–34 мкг/см³ для цефотаксима).

Описан пьезоэлектрический иммуносенсорный анализ для определения интерферона [5]. В этом случае антитела, специфичные к интерферону, иммобилизовали на электродах.

Изучены условия формирования распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора на основе углеродных нанотрубок для высокочувствительного определения рактопамина в прямом формате иммуноанализа. Диапазон определяемых содержаний рактопамина с помощью пьезоэлектрического сенсора составляет (нг/см³) 0,09–25, предел обнаружения 0,03 [6].

Ранее с помощью датчика на основе электродинамического сверхвысокочастотного (СВЧ) резонатора была оптимизирована процедура подготовки плёнок полистирола и иммобилизации на них микробных клеток для определения вирусных частиц и жизнеспособности микробных клеток [7].

Цель работы — оценка воздействия амоксициллина на микробные клетки, иммобилизованные на плёнках полистирола, с помощью датчика на основе электродинамического СВЧ резонатора для определения антибактериальной активности препарата.

Материал и методы

Микробные клетки и антибиотик. В работе использовались микробные клетки *Escherichia coli* XI-1 (IBPPM 632), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов) (<http://collection.ibppm.ru>).

Для получения бульонных культур этого штамма микроорганизмов использовалась жидкая питательная среда LB следующего состава (г/л): NaCl — 5; дрожжевой экстракт — 5 и пептон — 10. Культивирование проводилось при интенсивном перемешивании на шейкере (160 об/мин) в течение 18 ч при $30 \pm 1^\circ\text{C}$. После достижения логарифмической фазы роста клетки промывались дистиллированной водой (электропроводность 1,8 мкСм/см) и затем отделялись центрифугированием при 3354 g в течение 5 мин. Потом клетки суспендировались в дистиллированной воде и далее использовались для иммобилизации.

В работе использовали антибиотик амоксициллин (Sigma, США).

Детектирующая система. Для создания СВЧ электромагнитного резонатора использовался отрезок прямоугольного волновода длиной 74 мм с сечением $28,5 \times 12,6 \text{ мм}^2$. Один его торец был электрически закорочен запаянной медной пластинкой, а на втором — располагался тщательно отшлифованный стандартный фланец, на котором были установлены направляющие в виде медных полированных пластинок толщиной 0,8 мм для точного позиционирования пластины ниобата лития с диэлектрической проницаемостью порядка 35–40. Эта пластина полностью заполняла поперечное сечение волновода. Таким образом, резонанс возникал на отрезке волновода, ограниченном с одной стороны медной пластинкой, а с другой стороны — пластиной ниобата лития с чувствительным слоем. Чувствительный слой представлял собой тонкую плёнку полистирола, которая равномерно наносилась на поверхность пластины ниобата лития и модифицировалась в плазме высокочастотного (ВЧ) разряда аргона. Данное устройство с помощью коаксиально-волнового перехода и коаксиального кабеля подключалось ко входу измерителя S-параметров («Agilent», США). Коэффициент отражения S_{11} измерялся в диапазоне частот 5–8,5 ГГц.

Формирование и модификация тонких плёнок полистирола.

В работе микробные клетки иммобилизовали на поверхности тонких плёнок ПС, модифицированных в плазме ВЧ разряда аргона. Тонкие полимерные плёнки, в том числе и плёнки ПС, находят широкое применение в различных областях медицины, нано- и биотехнологий, а также в сенсорных технологиях [8–9]. Поверхностная плазменная модификация является уникальным инструментом, который позволяет избирательно улучшать поверхностные свойства материала, не затрагивая его объёмных свойств, и обеспечивать биосовместимость плёнок и увеличение их адсорбционных свойств [10–12].

В работе тонкие плёнки полистирола (ПС) получали методом центрифугирования в герметичной камере в атмосфере насыщенных паров четыреххлористого углерода при скорости вращения подложки 1800 об/мин. Предварительно ПС растворялся в четыреххлористом углероде (CCl_4 , 96 масс. %). Толщина

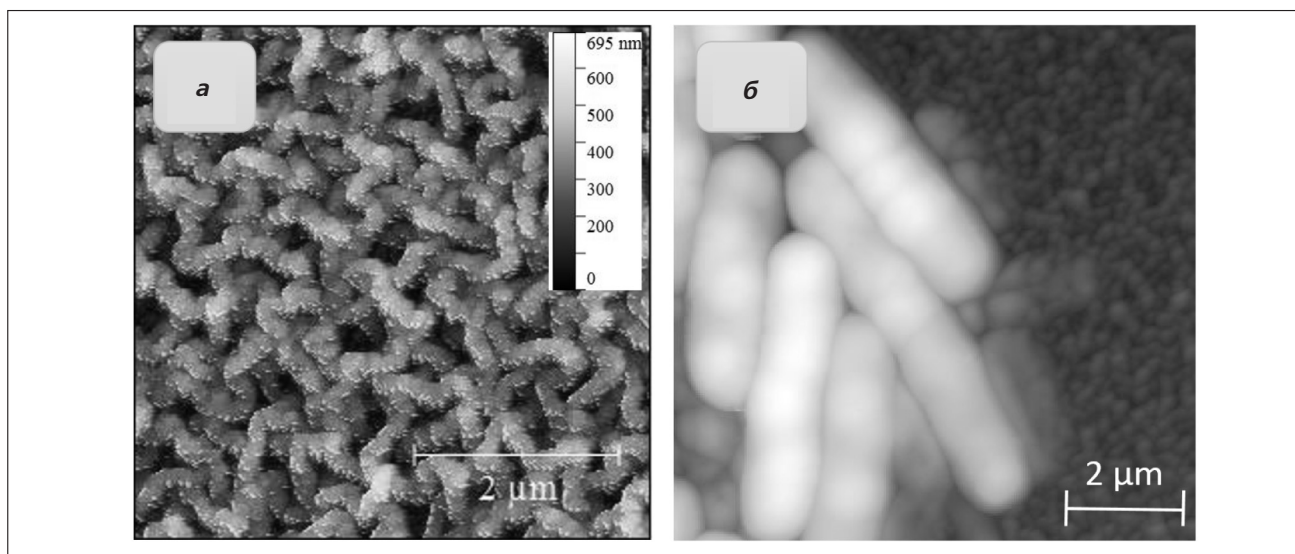


Рис. 1. СЗМ (а) изображение поверхности тонкой плёнки полистирола после модификации в плазме в течение 30 с, и (б) изображение плёнки, содержащей иммобилизованные микробные клетки.

полученных плёнок, оцененная по её сколу методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), составляла 150 ± 10 нм. Модификацию поверхности тонких плёнок ПС осуществляли в камере вакуумной установки Ogiop-40T («VTC», Южная Корея). Подложки с нанесённой плёнкой ПС располагались в зоне эрозии мишени магнетрона. ВЧ разряд (13,56 МГц) зажигался в атмосфере аргона, который заполнял камеру с расходом 100 мл/мин, а на мишень подавалось ВЧ смещение. Мощность разряда составляла ~ 100 Вт при давлении в камере 10^{-3} мбар. Обработка плёнки осуществлялась в течение 30 с.

Определение концентрации микробных клеток. Концентрацию микробных клеток определяли по величине оптической плотности суспензии на длине волны 540 нм (D_{540}) в кювете с толщиной оптического слоя 1,0 см на спектрофотометре «Specol-221» («Carl Zeiss Jena», Германия). Массу сухих клеток (г/л) определяли на основании предварительно построенных калибровочных кривых.

Иммобилизация микробных клеток. После подготовки плёнок ПС, модифицированных в плазме ВЧ магнетронного разряда, проводили оптимизацию условий иммобилизации микробных клеток. Были выбраны следующие условия иммобилизации: оптимальное время обработки плёнок в плазме — 30 с; время иммобилизации микробных клеток на плёнках ПС — 20 мин; количество клеток в исходной суспензии (микробная нагрузка) $\sim 1,34$ г сухой массы клеток/л. Использование очень большого количества клеток в суспензии оказалось нецелесообразным, поскольку в этом случае количество клеток, адсорбирующихся на носителе, уменьшалось, а остающихся в свободном состоянии — увеличивалось. Иммобилизацию клеток проводили в дистиллированной воде (электропроводность 1,8–2 мкСм/см), а количество микробных клеток определялось при 27°C. Оценка количества адсорбированных клеток осуществлялась по разнице их содержания в супернатанте после инкубации с сорбентом и в исходном растворе. Такой вариант расчёта не исключал ошибки при определении абсолютных величин сорбции, однако воспроизводимость результатов свидетельствовала об их достоверности.

Поверхность ПС до и после иммобилизации микробных клеток изучали методом сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) с помощью зондовой нанолаборатории Ntegra Spectra («NT-MDT», Россия). Изображения поверхности ПС получали в полуконтактном режиме с помощью кремниевого зонда NSG-10. Обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения Gwyddion. Зондовая микроскопия позволяла подробно рассмотреть модифицированную поверх-

ность плёнки, которая представлена цепочечными микродоменными структурами. На рис. 1 представлено СЗМ — изображение поверхности плёнки после модификации в плазме в течение 30 с (а), и (б) — СЗМ изображение плёнки после иммобилизации бактериальных клеток. На рис. 1 б хорошо видны иммобилизованные на поверхности ПС микробные клетки.

Далее ПС с иммобилизованными клетками использовали для измерений с помощью СВЧ резонатора. Общая схема проведения экспериментов представлена на рис. 2.



Рис. 2. Общая схема проведения экспериментов.

Результаты исследования

В работе применяли одну из наиболее многочисленных среди всех антибактериальных групп — бета-лактамы антибиотики [13]. Бета-лактамы антибиотики являются основой современной химиотерапии, так как занимают ведущее место в лечении большинства инфекционных заболеваний. В качестве антибактериального препарата использовали амоксициллин, как представитель группы бета-лактамов антибиотиков.

Активность бета-лактамов антибиотиков в значительной степени определяется их способностью взаимодействовать с клеточной поверхностью и изменять барьерные свойства цитоплазматической мембраны [14]. Амоксициллин активен в отношении ряда грамотрицательных палочек, поэтому в качестве модельного объекта исследования использовались микробные клетки *Escherichia coli* штамма XL-1. Ранее было показано, что клетки данного штамма являются чувствительными к амоксициллину [15].

После иммобилизации клеток на поверхности плёнок ПС изучалась возможность определения активности амоксициллина с помощью СВЧ резонатора. С помощью коаксиально-волноводного перехода электродинамический СВЧ резонатор подключался к измерителю S параметров E5071C и измерялась зависимость коэффициента отражения S_{11} от частоты в диапазоне 5,5–8,5 ГГц. Эта зависимость для модифицированной плёнки ПС, не содержащей иммобилизованных микробных клеток, представлена на рис. 3. Видно, что в указанном диапазоне наблюдались три ярко выраженных минимума, соответствующих резонансным частотам 5,67; 7,11 и 8,06 ГГц. Теоретический анализ показал, что для этих резонансов вдоль резонатора укладывается в волноводе одна, две и три половины длины волны, соответственно.

Третий резонанс (на частоте 8,06 ГГц) характеризовался наименьшим коэффициентом отражения (–10,1 дБ по мощности или 0,31 по амплитуде). В этом случае коэффициент стоячей волны (КСВ), равный ≈ 2 , оказался наименьшим из всех трёх

резонансов. Это означало, что изменение электрических граничных условий в плоскости, где находится пластинка ниобата лития, в этом случае будет сильнее влиять на параметры резонатора по сравнению с другими резонансами. В связи с этим дальнейшее изучение влияния иммобилизованных бактериальных клеток и биологических взаимодействий на плёнке ПС проводили именно для этого резонанса.

На рис. 4 представлена частотная зависимость коэффициента отражения S_{11} для резонатора с немодифицированной (0) и обработанной в плазме плёнкой полистирола, содержащей микробные клетки, после иммобилизации в течение 10 (1), 20 (2), 30 (3) и 40 (4) мин. На рис. 5 представлена зависимость коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте от времени иммобилизации

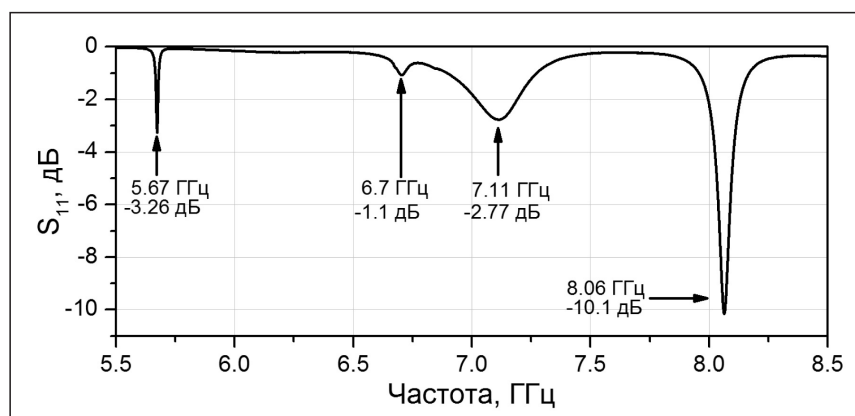


Рис. 3. Частотная зависимость коэффициента отражения S_{11} для резонатора с модифицированной в плазме плёнкой полистирола, не содержащей микробные клетки.

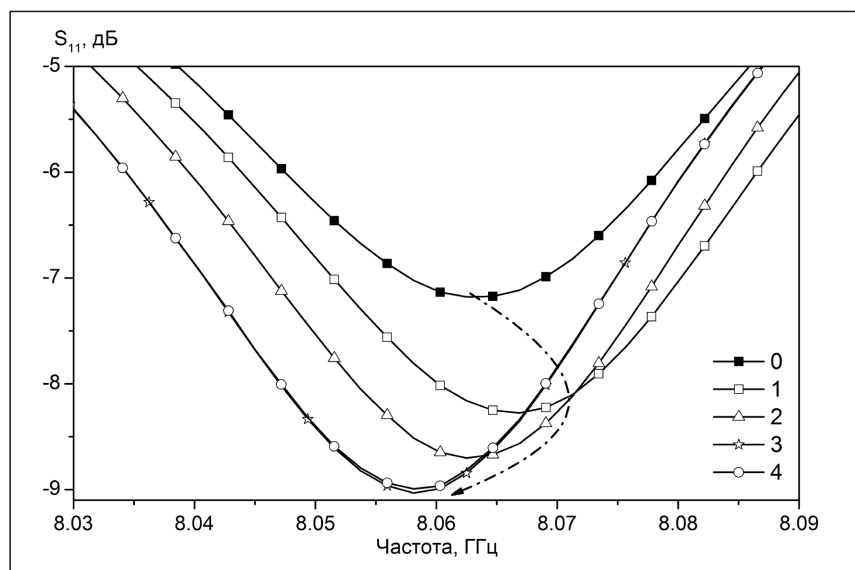


Рис. 4. Частотная зависимость коэффициента отражения S_{11} для резонатора с немодифицированной (0) и обработанной в плазме плёнкой полистирола, содержащей микробные клетки, после иммобилизации в течение 10 (1), 20 (2), 30 (3) и 40 (4) мин.

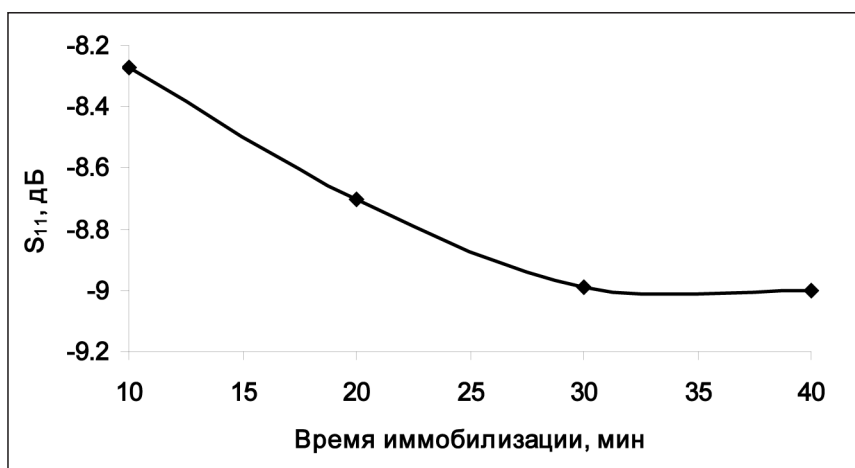


Рис. 5. Зависимость коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте от времени иммобилизации бактериальных клеток.

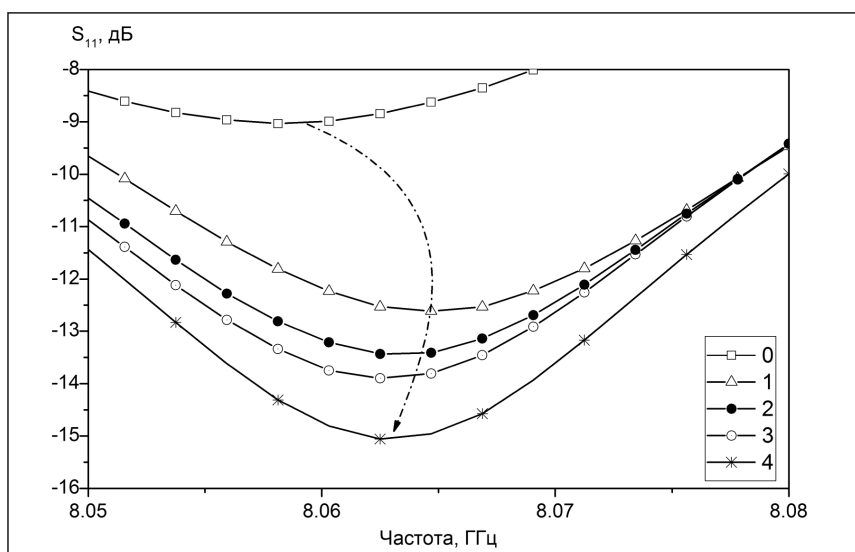


Рис. 6. Частотная зависимость коэффициента отражения S_{11} для резонатора после иммобилизации клеток (0), а также после внесения антибиотика, мкг/мл: (1) — 5, (2) — 10, (3) — 25, (4) — 50.

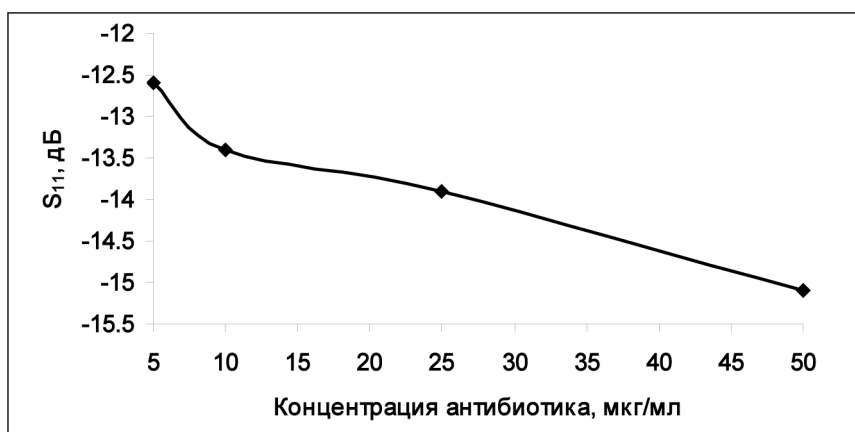


Рис. 7. Зависимость коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте от концентрации добавляемого антибиотика.

бактериальных клеток. Видно, что с увеличением времени иммобилизации от 10 мин до 30 мин коэффициент отражения S_{11} вблизи третьего резонансного пика увеличивается по абсолютной величине от 8,27 до 9 дБ. При этом частота пика уменьшилась от 8,067 до 8,057 ГГц. Дальнейшее увеличение времени иммобилизации (более 30 мин) не приводило к каким-либо изменениям. Исходя из полученных данных, время для иммобилизации клеток составляло 20 мин.

Далее к иммобилизованным клеткам добавляли разное количество антибиотика (5, 10, 25 и 50 мкг/мл) и определяли частотную зависимость параметра S_{11} вблизи третьего резонансного пика (рис. 6). Выбор концентраций антибиотика был обусловлен ранее проведенными исследованиями [15]. На рис. 7 представлена зависимость коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте от концентрации добавляемого амоксициллина.

Из рис. 7 видно, что при увеличении количества антибиотика от 5 до 50 мкг/мл величина S_{11} изменяется от -12,6 до -15,1 дБ. При этом во всех случаях резонансная частота менялась в небольших пределах: 8,065–8,062 ГГц. Поскольку изменение величины S_{11} зависит от концентрации антибиотика, полученные данные могут быть использованы для определения концентраций амоксициллина в водных растворах.

Была изучена динамика изменения коэффициента отражения от пленки полистирола с иммобилизованными клетками при воздействии амоксициллина в течение 10, 15 и 20 мин. На рис. 8 представлена частотная зависимость коэффициента отражения S_{11} для резонатора после иммобилизации клеток (0), а также после воздействия антибиотика (10 мкг/мл) в течение (1) — 10, (2) — 15, (3) — 20 мин.

Зависимость этого коэффициента на резонансной частоте от времени воздействия показана на рис. 9. Видно, что S_{11} увеличивается по абсолютной величине и, начиная с 15 мин, стремится к насыщению. При этом частота пика 8,065 ГГц остаётся неизменной. Дальнейшее увеличение времени взаимодействия не приводило к изменению наблюдаемой частотной зависимости параметра S_{11} .

Таким образом, воздействие антибиотика приводит к существенному изменению значения коэффициента отражения S_{11} на резонансной частоте при времени воздействия 15 мин и более. Это означает, что с помощью микробного датчика на основе электродинамического СВЧ резонатора возможно провести оценку активности антибиотика в исследуемом диапазоне концентраций при времени анализа 15 мин.

Заключение

В работе показана возможность иммобилизации микробных клеток *E.coli* методом адсорбции на ПС носителе и оптимизированы условия проведения анализа при анализе амоксициллина с помощью сенсорной системы на основе электродинамического СВЧ резонатора. Описанный способ может быть использован для определения активности образцов антибактериального препарата на всех стадиях производства антибиотиков и для определения стабильности антибиотиков в процессе их хранения. Вопрос сохранения активности препаратов возникает не только при непосредственном применении антибиотика в качестве лекарственного препарата, но и в процессе их хранения, а также при производстве антибиотиков. Поскольку изменение величины S_{11} зависит от концентрации антибиотика, полученные данные могут быть использованы для определения концентраций

амоксициллина в водных растворах. Преимуществом разработанного подхода является возможность проведения анализа во внелабораторных условиях за короткий промежуток времени, а также возможность полной автоматизации процедуры анализа и обработки результатов.

Работа выполнена в рамках государственного задания и частично поддержана Российским Фондом Фундаментальных исследований (Проекты № 19-07-00304, 18-57-7802).

ЛИТЕРАТУРА

1. De Miguel-Ramos M., Díaz-Durán B., Escolano J., Barba M., Mirea T., Olivares J. et al. Gravimetric biosensor based on a 1.3 GHz AlN shear-mode solidly mounted resonator. *Sensors and Actuators B* 2017; 239: 1282–1288. doi: 10.1016/j.snb.2016.09.079
2. Di Pietrantonio F., Benettia M., Cannata D., Veronab E., Girasolec M., Foscat M. et al. A Shear horizontal surface acoustic wave biosensor for a rapid and specific detection of d-serine. *Sensors and Actuators* 2016; 226: 1–6. doi: 10.1016/j.snb.2015.11.099

3. Шукшина Е.И., Фарафонова О.В., Шанин И.А., Гражугулен С.С., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. Аффинные взаимодействия на поверхности пьезоэлектрического сенсора, модифицированного углеродными нанотрубками, при определении фторхинолонов. Сорбционные и хроматографические процессы. — 2018. — № 18 (3). — С. 394–403. / Shukshina E.I., Farafonova O.V., Shanin I.A., Grazhulene S.S., Eremin S.A., Ermolaeva T.N. Affinnye vzaimodejstviya na poverkhnosti p'zeoel'ektricheskogo sensora, modifitsirovannogo uglerodnymi nanotrubkami, pri opredelenii ftorkhinolonov. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* 2018; 18 (3): 394–403. [in Russian] doi: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/544>.

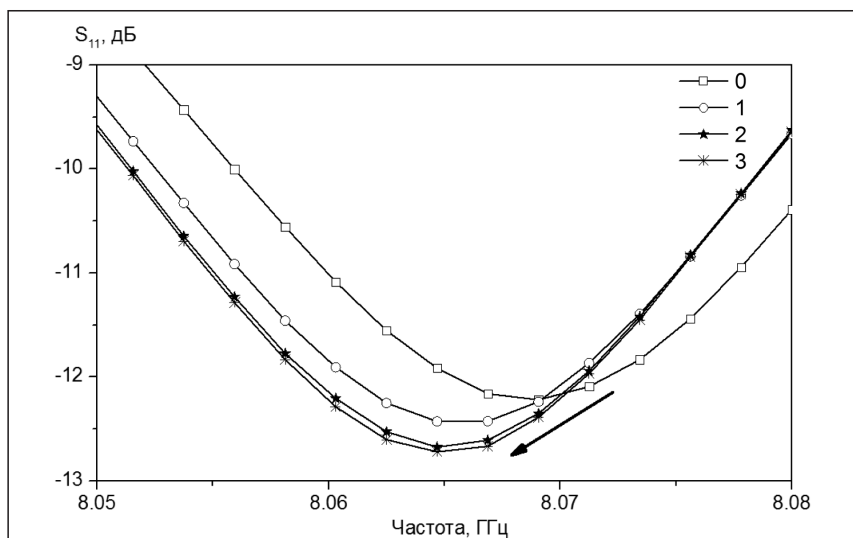


Рис. 8. Частотная зависимость коэффициента отражения S_{11} для резонатора после иммобилизации клеток (0), а также после воздействия антибиотика в течение (1) — 10 мин, (2) — 15 мин, (3) — 20 мин.

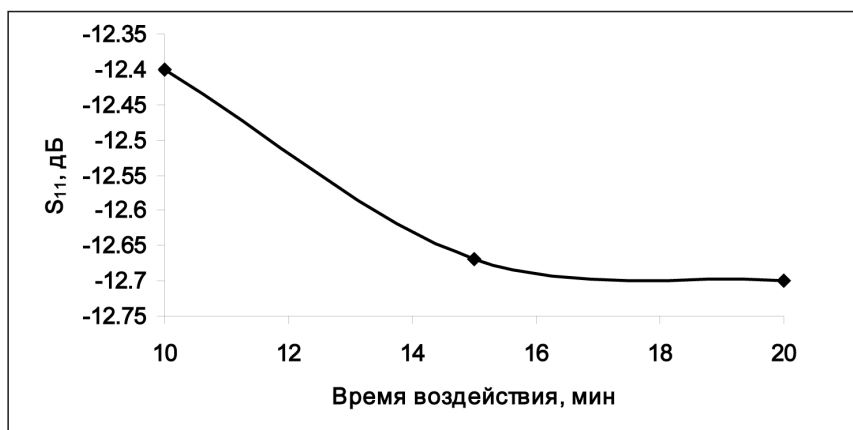


Рис. 9. Зависимость коэффициента отражения на резонансной частоте от времени воздействия антибиотика.

4. Фарафонова О.В., Потанина А.Ю., Тарасова Н.В., Ермолаева Т.Н. Синтез методом фотополимеризации и применение тонких плёнок полимеров с молекулярными отпечатками для молекулярного распознавания цефалоспоринов. Сорбционные и хроматографические процессы. — 2018. — № 18 (4). — С. 495–504. / Farafonova O.V., Potanina A.Yu., Tarasova N.V., Ermolaeva T.N. Sintez metodom fotopolimerizatsii i primeneniye tonkikh plenok polimerov s molekulyarnymi otpechatkami dlya molekulyarnogo raspoznavaniya tsefalosporinov. Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy 2018; 18 (4): 495–504. [in Russian]
5. Don E., Farafonova O., Pokhil S., Barykina D., Nikiforova M., Shulga D. et al. Use of Piezoelectric Immunosensors for Detection of Interferon-Gamma Interaction with Specific Antibodies in the Presence of Released-Active Forms of Antibodies to Interferon-Gamma. Sensors (Basel) 2016; 16 (1): 96. doi:10.3390/s16010096
6. Фарафонова О.В., Шукишина Е.И., Гражжулене С.С., Ермолаева Т.Н. Поверхностные ансамбли на основе углеродных нанотрубок в пьезоэлектрическом иммуносенсоре для высокочувствительного определения рактопина. Сорбционные и хроматографические процессы. — 2017. — № 17 (4). — С. 548–556. / Farafonova O.V., Shukshina E.I., Grazhulene S.S., Ermolaeva T.N. Poverkhnostnye ansambli na osnove ugleodnykh nanotrubok v p'zelektricheskom immunosensore dlya vysokochuvstvitel'nogo opredeleniya raktopina. Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy 2017; 17 (4): 548–556. [in Russian]
7. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Смирнов А.В., Караваева О.А., Бородин И.А. Биосенсор для детекции бактериофагов на основе сверхвысокочастотного резонатора. Прикладная биохимия и микробиология. — 2017. — № 53 (6). — С. 642–650. / Gulij O.I., Zajtsev B.D., Smirnov A.V., Karavaeva O.A., Borodina I.A. Biosensor dlya detektsii bakteriofagov na osnove sverkhvysokochastotnogo rezonatora. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya 2017; 53 (6): 642–650. [in Russian]
8. Tsui O.K.C. Polymer thin films. World Scientific. Co-edited by O. K. C. Tsui and T. P. Russell, World Scientific, Singapore; 2008; 267–294.
9. Otero T.F. Polymer sensors and actuators. Eds. Y. Osada, D. E. De Rossi. Berlin; Springer; 2000; 295–324.
10. Шереметьев С.В., Штейнберг Е.М. Использование функциональных полимеров в медицине. Казань: СибАК; 2012. / Sheremet'ev S.V., Shtejnberg E.M. Ispol'zovanie funktsional'nykh polimerov v meditsine. Kazan': SibAK; 2012. [in Russian]
11. Chu P.K., Chen J.Y., Wang L.P., Huang N. Plasma-surface modification of biomaterials. Mat Sci Eng R 2002; 36 (5): 143–206.
12. Jacobs T., Morent R., De Geyter N., Dubruel P., Leys C. Plasma Surface Modification of Biomedical Polymers: Influence on Cell-Material Interaction Plasma. Chem Plasma Process 2012; 32 (5): 1039–1073.
13. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2017.
14. Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Gillespie SH, McHugh TD (eds.), Methods in Molecular Biology, vol. 642, Springer Science+Business Media, LLC 2010.
15. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Семенов А.С., Ларионова О.С., Караваева О.А., Бородин И.А. Оценка воздействия амоксицилина на микробные клетки методом электроакустического анализа. Биофизика. — 2018. — № 63 (3). — С. 496–502. / Gulij O.I., Zajtsev B.D., Semenov A.S., Larionova O.S., Karavaeva O.A., Borodina I.A. Otsenka vozdeystviya amoksisillina na mikrobnnye kletki metodom elektroakusticheskogo analiza. Biofizika 2018; 63 (3): 496–502. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гулий Ольга Ивановна — д. б. н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН), Саратов; профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Зайцев Борис Давыдович — д. физ.-мат. наук, профессор, заведующий лабораторией физической акустики Саратовского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Саратов

Смирнов Андрей Владимирович — к. физ.-мат. н., старший научный сотрудник лаборатории электронных процессов в полупроводниковых материалах Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Москва

Караваева Ольга Александровна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН), Саратов

Алсовэиди Али Кадхим Мохаммед — аспирант очной формы обучения Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского, Саратов

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

Бородин Ирина Анатольевна — к. физ.-мат. н., ведущий научный сотрудник лаборатории физической акустики Саратовского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Саратов

Антимикробные свойства водорастворимых полисахаридов и спиртовых экстрактов мицелия *Laetiporus sulphureus* (bull.) Murrill и разработка биотехнологии его получения в иммобилизованной культуре на бактериальной целлюлозе

*И. А. ГАВРЮШИНА^{1,2}, Т. И. ГРОМОВЫХ², Н. Б. ФЕЛЬДМАН², С. В. ЛУЦЕНКО²,
В. И. ПОНОМАРЕНКО¹, О. В. КИСИЛЬ¹, В. С. САДЫКОВА¹

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

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

Antimicrobial Properties of Water-Soluble Polysaccharides and Alcoholic Extracts of *Laetiporus Sulphureus* (Bull.) Murrill Mycelium and Development of Biotechnology for Its Production in Immobilized Culture on Bacterial Cellulose

* I. A. GAVRYUSHINA^{1,2}, T. I. GROMOVYKH², N. B. FELDMAN², S. V. LUTSENKO²,
V. I. PONOMARENKO¹, O. V. KISIL¹, V. S. SADYKOVA¹

¹ FSBI Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

Статья посвящена разработке нового способа получения мицелия базидиомицета *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill, иммобилизованного на матрице бактериальной целлюлозы. Мицелий содержит биологически активные соединения, с антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий, в том числе в отношении резистентного стафилококка. Целью работы было получение иммобилизованного мицелия путём совместного культивирования *L.sulphureus* с продуцентом бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii*. Исследованиями авторов установлено, что при совместном культивировании базидиального штамма *L.sulphureus* со штаммом-продуцентом бактериальной целлюлозы *G.hansenii* продуктивность увеличивается на синтетической среде Н5/1 в 3,2 раза, а на натуральной среде Maltax-10 (концентрация 5%) в 1,9 раза. Полученный иммобилизованный мицелий *L.sulphureus*, водные экстракты которого, содержащие глюканы, обладают антибактериальными свойствами.

Ключевые слова: *Laetiporus sulphureus*, ксилотрофный базидиомицет, биотехнология, иммобилизованный мицелий, бактериальная целлюлоза, антимикробная активность, *Gluconacetobacter hansenii*.

The article discusses the development of a new method of producing *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill basidiomycete mycelium immobilized on a bacterial cellulose matrix. Mycelium contains biologically active compounds with antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, including resistant staphylococcus. The aim of the work was to obtain immobilized mycelium by co-cultivation of *L.sulphureus* with the producer of bacterial cellulose *Gluconacetobacter hansenii*. The authors found that when co-culturing the basidial *L.sulphureus* strain with the bacterial cellulose producing *G.hansenii* strain, productivity increases by 3.2 times on H5/1 synthetic medium and by 1.9 times on natural Maltax-10 medium (concentration 5%). The resulting immobilized *L.sulphureus* mycelium has antibacterial properties; its aqueous extracts contain glucans.

Keywords: *Laetiporus sulphureus*, xylophilic basidiomycete, biotechnology, immobilized mycelium, bacterial cellulose, antimicrobial activity, *Gluconacetobacter hansenii*.

Базидиомицет вида *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill — серно-жёлтый трутовик, относится к царству *Fungi*, отделу *Basidiomycota*, классу *Basidiomycetes*, подклассу *Homobasidiomycetideae*, порядку *Aphyllphorales*, семейству *Polyporaceae*, роду *Laetiporus*. Серно-жёлтый трутовик является

факультативным сапротрофом, вызывающим красно-бурую деструктивную и стволую гниль, красно-бурую призматическую ядровую гниль у лиственных деревьев. Представитель вида *L.sulphureus* встречается в Сибири, странах Юго-Восточной Азии. Ареал распространения этого вида находится также в Европе, Северной и Южной Америке [1–3].

Представители этих видов синтезируют и накапливают в мицелии водорастворимые полисахариды (бета-глюканы), каротиноиды и

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, ул. Б. Пироговская, д. 11, стр. 1. НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе

другие биологически активные соединения. Бета-глюканы и каротиноподобные соединения, синтезируемые *L.sulphureus*, обладают иммуномодулирующими, противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами. Иммуномодулирующие свойства известны и для спиртовых экстрактов мицелия; экстракты увеличивают выход интерлейкина IL-4 и уменьшают воспалительный запальный цитокинез фактора некроза опухолей α -TFN [3, 4].

Спиртовые экстракты мицелия обладают противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса первого типа (ВПГ-1), который проявляет устойчивость к ингибиторам ацикловиру и фосфорноуксусной кислоте, а также обладает противовирусной активностью в отношении вирусов растений. Кроме того, для *L.sulphureus* известна антифунгальная активность в отношении дереворазрушающих грибов: *Coniophora cerebella*, *Coriolus versicolor*, *Fomes fomentarius*, *Trametes radiciperda* и *Trichoderma viride* [5–9].

Получить биомассу мицелия базидиальных грибов возможно путём твердофазного и жидкофазного культивирования. Использование биотехнологических методов в получении биомассы мицелия имеет ряд преимуществ, таких как безотходность производства препаратов, недефицитность сырьевых ресурсов и неограниченная возможность. Рост базидиальных грибов зависит от оптимального состава питательной среды и от условий культивирования: температуры, pH питательной среды, влажности субстрата, аэрации, света [2, 3]. Для повышения продуктивности биомассы мицелия базидиомицетов необходимо проводить оптимизацию условий культивирования и состава питательной среды. Одним из основных факторов при культивировании является наличие в среде питательных веществ, преимущественно источников углерода [10, 11].

Перспективным направлением является получение биологически активных соединений на основе мицелия базидиальных грибов. Однако существует проблема получения мицелия видов *L.sulphureus* в условиях жидкофазной ферментации.

С целью решения данной проблемы повышенный интерес вызывает такой уникальный нетоксичный, биосовместимый и биоразлагаемый полимер как бактериальная целлюлоза, которая будет использоваться в качестве подложки и источника питательных веществ. В биотехнологии бактериальную целлюлозу рекомендуют для иммобилизации клеток и трудно культивируемых продуцентов [12–14].

Целью работы — получение иммобилизованного мицелия штамма *L.sulphureus* MZ-22 на бактериальной целлюлозе, изучение его биохимического состава и антимикробных свойств.

Материал и методы

Получение мицелия и матриц для иммобилизации проводили с использованием штаммов: *L.sulphureus* (Bull.) Murrill штамм MZ-22 (BKM F-4276D) — ксилотрофного базидиомицета и *G.hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-1054) — продуцента бактериальной целлюлозы [10, 14]. Иммобилизацию мицелия проводили при совместном культивировании базидиального гриба *L.sulphureus* со штаммом-продуцентом бактериальной целлюлозы *G.hansenii* в двух вариантах: на синтетической среде состава, г/л: глюкоза — 7,0; дрожжевой экстракт — 5,0; Na_2HPO_4 — 0,27; K_2HPO_4 — 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,3; моногидрат лимонной кислоты — 0,115, pH среды 6,5 и на натуральной среде Мальтакс-10 (5%). Культивирование проводили в течение 30 сут при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Посевной материал продуцента *G.hansenii* выращивали при перемешивании 120 об/мин в течение 5 сут. на жидкой среде Н5 следующего состава, г/л: глюкоза — 70,0; дрожжевой экстракт — 5,0; Na_2HPO_4 — 2,7; K_2HPO_4 — 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,0; моногидрат лимонной кислоты — 1,15; спирт — 5,0, pH 4,0.

Посев инокулята штамма *G.hansenii* проводили суспензией с титром 10^8 КОЕ/мл в объеме 10 см³. Посевной материал продуцента *F.officinalis* выращивали на агаровой среде Maltax-10 в концентрации 5%. Посев проводили агаровым блоком газонной культуры мицелия *L.sulphureus* размером 10×10×5 мм³. Через 48 ч в колбы вносили инокулят агарового блока площадью 1 см² мицелия *L.sulphureus* и культивировали смешанную культуру в течение 30 сут. в термостате при температуре $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

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

Продуктивность мицелия рассчитывали по количеству белка в образцах иммобилизованного мицелия на бактериальной целлюлозе, следующим образом: А — количество мицелия в образце (%), В — количество белка в образце мицелия, полученном в монокультуре (%); С — количество белка в иммобилизованном мицелии на бактериальной целлюлозе, полученного в смешанной культуре (%), тогда количество мицелия в нем будет составлять:

$$A = B \times 100 / C.$$

Количественное содержание глюкозых определяли в мицелии базидиомицетов *L.sulphureus*, полученном как при моно-, так и при совместном культивировании со штаммом-продуцентом бактериальной целлюлозы *G.hansenii*.

Мицелий, высушенный в сухожаровом шкафу при температуре 60°C до постоянной массы, измельчали в гранитной ступке. Растёртый мицелий пересыпали в колбу с притёртой крышкой и заливали дистиллированной водой в соотношении 1 мас. ч. сырья : 30 об. ч. дистиллированной воды. Суспензию взбалтывали и настаивали в течение 60 мин при температуре $20\text{--}22^\circ\text{C}$. Настоявшуюся суспензию взбалтывали, затем отбирали $1/4$ часть от общего объёма и убирали в холодильник на 24 ч. $3/4$ части суспензии от общего объёма дезинтегрировали ультразвуком при помощи ультразвукового дезинтегратора Sonicator Q500, QSONICA. Дезинтеграцию проводили в течение 5 мин, амплитуда (интенсивность) составляла 40%. После дезинтеграции отбирали $1/4$ часть суспензии и убирали в холодильник на 24 ч. Оставшуюся часть суспензии повторно дезинтегрировали ультразвуком при тех же условиях и убирали в холодильник на 24 ч.

После настаивания в холодильнике образцы суспензий (без дезинтеграции, дезинтеграция 5 мин, дезинтеграция 10 мин) пропускали через бумажный фильтр. Профильтрованную жидкость разбавляли в 4 раза 96% этанолом, тщательно перемешивали и центрифугировали 60 с при 12000 об/мин. Полученный осадок после центрифугирования высушивали в сухожаровом шкафу при температуре $50\text{--}55^\circ\text{C}$. Сухой осадок вы-

Таблица 1. Показатели продуктивности *Laetiporus sulphureus* при моно- и совместном культивировании с *Gluconacetobacter hansenii*

Штамм	Продуктивность, г/л	Продуктивность, г/л в сутки	Удельная продуктивность, %
<i>L.sulphureus</i> в монокультуре	2,87	0,10	9,57
<i>L.sulphureus</i> на бактериальной целлюлозе	13,44	0,45	44,80

деленных полисахаридов взвешивали на аналитических весах марки Axis.

Количество каротиноидных пигментов, содержащихся в спиртовых экстрактах мицелия штамма *L.sulphureus*, полученном, как при моно-, так и при совместном культивировании с *G.hansenii* определяли фотометрическим методом при длине волны 450 нм. Разделение фракции каротиноидов, полученной из мицелия *L.sulphureus* проводили методом ВЭЖХ при 450 нм. на колонке Poroshell C18 (4,6×50 мм; 2,7 мкм) в градиенте ацетонитрила (от 0 до 100%) при скорости потока 0,5 мл/мин.

Спектр антимикробной активности определяли на тест-культурах условно-патогенных микроскопических грибов и бактерий из коллекции культур Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе методом диффузии в агар на тест-культурах ФГБНУ «НИИНА».

Для определения антимикробной активности препаратов были использованы следующие культуры бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 21027 (=209 P), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, условно-патогенные грибы принадлежали к микромицетам рода *Aspergillus*: *A.fumigatus* КБП F24, *A.niger* INA 00760; дрожжевые условно-патогенные грибы — *Candida albicans* ATCC 2091. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с нистатином для грибов (80 мкг/мл, «НИИ Пастера», Россия) и ампициллином для бактерий («НИИ Пастера», 10 мкг/мл).

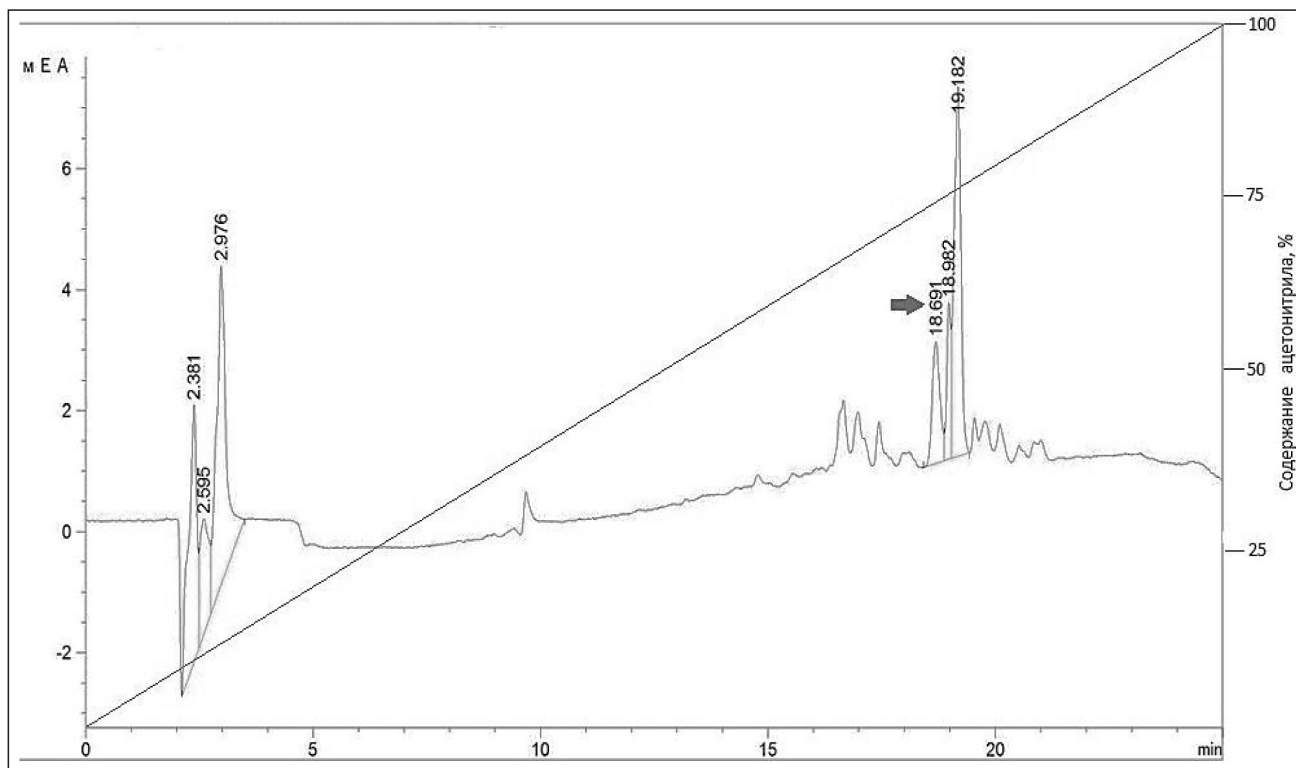
Для экспериментов по определению антимикробной активности тестируемых соединений готовили инокулюм бактериальных тест-культур, для чего использовали чистую суточную культуру бактерий, выращенных на соответствующих плотных питательных средах при температуре 35°C. Далее в

стерильном физиологическом растворе (0,85% NaCl) готовили взвесь микроорганизмов, доводя её до определённой плотности. Плотность бактериальных суспензий составляла 0,5 по стандарту МакФарланда ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) и при дальнейшем разведении бульоном Мюллера–Хинтона в 100 раз концентрация микробных клеток снижалась до 5×10^5 КОЕ/мл.

Результаты исследований

Штамм *L.sulphureus* хорошо растёт совместно с *G.hansenii* на синтетической среде Н-5, формируя на бактериальной целлюлозе лёгкий, воздушный мицелий оранжевого цвета. На поверхности питательных сред на 5–7-е сутки совместного жидкофазного стационарного культивирования образуются различной толщины плёнки бактериальной целлюлозы, а затем в условиях иммобилизации начинается рост мицелия базидиомицетов. Сравнительный анализ показателей продуктивности штамма *L.sulphureus* при монокультивировании и в условиях иммобилизации при совместном культивировании с *G.hansenii* представлен в табл. 1.

При совместном культивировании общая продуктивность штамма *L.sulphureus* выше в 4,7 раза, чем при монокультивировании, и составляет 13,44 г/л. Суточная и удельная продуктивность этого штамма в смешанной культуре с *G.hansenii*



ВЭЖХ каротиноидного комплекса спиртовых экстрактов мицелия *L.sulphureus*.

Таблица 2. Содержание водорастворимых глюконов в мицелии *Laetiporus sulphureus*, мг/г

Образец мицелия	<i>L.sulphureus</i> в монокультуре			<i>L.sulphureus</i> на бактериальной целлюлозе		
Время дезинтеграции	0 мин	5 мин	10 мин	0 мин	5 мин	10 мин
Количество глюконов в мицелии, мг/г	6,9	7,5	11,3	12,2	14,9	27,2

Таблица 3. Антибактериальная активность водных экстрактов мицелия *Laetiporus sulphureus*

Водорастворимые экстракты	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 21027	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>L.sulphureus</i> в монокультуре	24,35±0,21	18,32±0,17	Не активны
<i>L.sulphureus</i> на бактериальной целлюлозе	22,32±0,14	16,14±0,22	Не активны

на синтетической среде Н-5 составила, соответственно, 0,45 г/л в сутки и 44,80%.

Спиртовые экстракты мицелия *L.sulphureus* представляют собой в основном смесь каротиноидов. Исследования показали, что количество каротиноидных пигментов в иммобилизованном мицелии *L.sulphureus* на бактериальной целлюлозе составляет 0,21%, а в монокультуре — 0,15%. Установлено, что наибольшее количество каротиноидных пигментов синтезируется в иммобилизованном на бактериальной целлюлозе мицелии *L.sulphureus*.

При концентрации ацетонитрила от 70 до 75% с колонки в виде трёх пиков элюируются основные каротиноиды мицелия *L.sulphureus*: латипоровая кислота А, дезоксилатипоровая кислота и масутакиевая кислота А, что соответствует данным литературы (рисунок).

Результаты исследования водорастворимых фракций мицелия показали, что глюконов в мицелии *L.sulphureus* иммобилизованном на бактериальной целлюлозе содержится в 2 раза больше, чем в монокультуре. Наибольший выход глюконов был получен после 10 мин дезинтеграции ультразвуком, как в монокультуре, так и в иммобилизованном мицелии. Так, в монокультуре мицелия *L.sulphureus* содержится 11,3 мг/г и в иммобилизованном мицелии 27,2 мг/г глюконов, соответственно (табл. 2).

Оценка антимикробной активности водных и спиртовых экстрактов монокультуры и иммобилизованного на бактериальной целлюлозе мицелия *L.sulphureus* показала, что спиртовые экстракты не обладают антимикробной активностью в отношении всех тест-организмов. Водорастворимые фрак-

ции, содержащие глюконы в количестве 4 мг/мл, обладали высокой активностью в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, но оказались неактивны в отношении *Escherichia coli* ATCC 25922 и дрожжевых и мицелиальных грибов. Содержание антибиотических компонентов не зависит от способа культивирования мицелия и не оказывает влияние на антимикробную активность (табл. 3).

Заключение

В наших исследованиях показано, что иммобилизованное культивирование базидиомицета *L.sulphureus* с *G.hansenii* позволяет увеличить продуктивность мицелия в 4,7 раза. В биомассе, полученной при совместном культивировании с *G.hansenii*, доля иммобилизованного мицелия *L.sulphureus* составляет 81,96%, что доказано наличием белка (14,46%), каротиноидных пигментов (0,21%). Таким образом, культивирование *L.sulphureus* и *G.hansenii* позволяет получать иммобилизованный мицелий на бактериальной целлюлозе с большей продуктивностью, что перспективно для разработки биотехнологии антимикробных веществ водорастворимых соединений, содержащихся в биомассе.

Разделы работы, посвящённые ВЭЖХ анализу активных компонентов биомассы грибов (каротиноидов и агарациновой кислоты), а также определению антимикробной активности, выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10073).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухало А.С., Бабицкая В.Г., Бисёко Н.А. и др. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре. Сборник научных трудов в 2-х т. Киев: Альтпресс, 2011. — Т. 1. — 212 с. / Bukhalo A.S., Babitskaya V.G., Bis'ko N.A. i dr. Biologicheskie svoystva lekarstvennykh makromitsetov v kul'ture. Sbornik nauchnykh trudov v 2-kh t. Kiev: Al'tpress, 2011; 1: 212. [in Russian]
2. Ильина Г.В., Ильин Д.Ю. Ксилотрофные базидиомицеты в чистой культуре. Пенза: РИО ПГСХА, 2013. — С. 224. / Il'ina G.V., Il'in D.Yu. Ksilotrofnye bizidiomitsety v chistoy kul'ture. Penza: RIO PGSKhA, 2013; 224. [in Russian]
3. Sulkowska-Ziaja K., Muszynska B., Gawalska A., Salaciak K. *Laetiporus sulphureus* — chemical composition and medical value. Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum cultus 2018; 17: 1: 87–96. doi: 10.24326/asphc.2018.1.8
4. Klaus A., Niksic M., Kozarski M. et al. The edible mushroom *Laetiporus sulphureus* as potential source of natural antioxidants. International Journal of Food Sciences and Nutrition 2013; 64: 5: 599–610.
5. Kovács, D., Vetter J. Chemical composition of mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill. Acta Alimentaria 2015; 44: 1: 104–110.
6. Wu H.T., Lu F.H., Su Y.C., Ou H.Y., Hung H.C., Wu J.S., Yang Y.C., Chang C. J. In vivo and in vitro antitumor effects of fungal extracts. Molecules 2014; 19 (2): 2546–2556.
7. Zhang J., Jianhua L., Zhao L., Shui X., Wang L. Antioxidant and antimicrobial activities and chemical composition of submerged cultivated mycelia of *Laetiporus sulphureus*. Chemistry of Natural Compounds 2018; 54: 6: 1187–1190.
8. Kolundzic M., Grozdanic N., Stanojkovic T., Milenkovic M., Dinic M., Golic N., Kojic M., Kundakovic T. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Sulphur Shelf Medicinal Mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Agaricomycetes), from Serbia. Intern J Med Mushrooms 2016; 18: 6: 469–486.
9. Трошкова Г.П., Костина Н.Е., Бардашева А.В. Базидиальные грибы Западной Сибири — продуценты противоопухолевых соединений. Стабильность антибактериальной активности мицелиальных грибов в процессе хранения. Успехи медицинской микологии. — 2014. — Т. 12. — С. 355–358. / Troshkova G.P., Kostina N.E., Bardasheva A.V. Bazidial'nye griby

- Zapadnoj Sibiri — produkty protivoopukholevykh soedinenij. Stabil'nost' antibakterial'noj aktivnosti mitselial'nykh gribov v protsesse khraneniya. Uspekhi Meditsinskoj Mikologii 2014; 12: 355–358. [in Russian]
10. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М., Агафонова С.В. Антиоксидантные компоненты плодовых тел *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr) Murr. Прикладная биохимия и микробиология. — 2011. — Т. 47. — № 4. — С. 462–468. / Olennikov D.N., Tankhaeva L.M., Agafonova S.V. Antioksidantnye komponenty plodovykh tel *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr) Murr. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya 2011; 47: 4: 462–468.
 11. Hwang H.S., Yun J.W. Hypoglycemic effect of polysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* on streptozotocin-induced diabetic rats. Biotechnol Bioproc Engineer 2010; 15: 173–181.
 12. Костина Н.Е., Проценко М.А. Сравнение плодового тела и культивируемого мицелия ксилотрофных базидиомицетов. Успехи медицинской микологии. — 2016. — Т. 16. — С. 287–289. / Kostina N.E., Protsenko M.A. Sravnenie plodovogo tela i kul'tiviruемого mitseliya ksilotrofnykh bazidiomitsetov. Uspekhi Meditsinskoj Mikologii 2016; 16: 287–289. [in Russian]
 13. Nimeskern L., Martínez Á. H., Sundberg J., Gatenholm P., Müller R., Stok K.S. Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement. J Mech Behav Biomed 2013; 22: 12–21.
 14. Gromovykh T.I., Sadykova V.S., Lutcenko S.V. et al. Bacterial cellulose synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* for medical applications. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya 2017; 53: 1: 69–75.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гаврюшина Ирина Александровна — аспирант лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

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

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

Луценко Сергей Викторович — д. б. н., профессор, заведующий кафедрой биотехнологии ФГАОУ ВО Первый

МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Пономаренко Валерий Иванович — к. фарм. н., заведующий отдела аспирантуры ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Кисиль Ольга Валерьевна — к. х. н., старший научный сотрудник лаборатории химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Садыкова Вера Сергеевна — д. б. н., заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Противовирусная активность Кагоцела на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции

*В. В. ЗАРУБАЕВ, А. В. ГАРШИННИНА, А. В. СЛИТА, С. В. БЕЛЯЕВСКАЯ, И. Н. ЛАВРЕНТЬЕВА

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт им. Пастера, Санкт-Петербург

Antiviral Activity of Kagocel® on the Model of Experimental Lethal Influenza Infection

*V. V. ZARUBAEV, A. V. GARSHININA, A. V. SLITA, S. V. BELYAEVSKAYA, I. N. LAVRENTIEVA

Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg

Несмотря на очевидные успехи в области вакцинации и терапии, грипп остаётся плохо контролируемой инфекцией с высокой заболеваемостью и смертностью. В настоящем исследовании изучена противовирусная активность индуктора интерферона Кагоцела на модели летальной гриппозной пневмонии у мышей. Показано, что лечебно-профилактическое применение Кагоцела приводит к дозозависимому снижению специфической смертности и подавлению репродукции вируса в ткани лёгких. Эффект Кагоцела был статистически идентичен эффекту препарата сравнения — арбидолу.

Ключевые слова: экспериментальная гриппозная инфекция, противовирусная активность, Кагоцел.

Despite the obvious advances in vaccination and therapy, influenza remains a poorly controlled infection with high morbidity and mortality. This study examined the antiviral activity of interferon inducer Kagocel on a mouse model of lethal influenza pneumonia. It has been shown that the therapeutic and prophylactic use of Kagocel leads to a dose-dependent decrease in specific mortality and suppression of virus reproduction in lung tissue. The effect of Kagocel was statistically identical to the effect of the reference drug — Arbidol (umifenovir).

Keywords: experimental lethal influenza infection, antiviral activity, Kagocel.

Введение

Грипп представляет собой наиболее распространённую и опасную инфекцию из всех респираторных вирусных патологий человека. Ежегодно эпидемии гриппа приводят к большому числу заболевших, среди которых наибольшей опасности подвергаются пациенты из групп риска: дети, пожилые, беременные женщины и лица с иммунодефицитами любой этиологии [1]. Симптомы гриппа включают высокую температуру и лихорадку, головную боль, интоксикационный синдром. В случаях тяжёлого гриппа отмечается присоединение вторичной бактериальной инфекции, развивается цитокиновый шторм, многочисленные внутренние геморрагии, включая геморрагический отёк лёгких, отёк мозга и зачастую наблюдается летальный исход [2].

Вирус гриппа принадлежит к семейству *Orthomyxoviridae*. Вирионы представляют собой сферические или филаментозные частицы диаметром 80–100 нм. Геном вируса представлен сегментированной одноцепочечной РНК негативной полярности. После проникновения в

клетку и «раздевания» вириона сегменты генома попадают в цитоплазму, где вирусная полимераза осуществляет транскрипцию и репликацию вРНК. В результате образуются молекулы вирус-специфической матричной РНК (мРНК) и комплементарной РНК (кРНК), соответственно. На матрице кРНК впоследствии синтезируется цепь вРНК, входящая затем в состав вирионов потомства. мРНК транслируется при помощи клеточных механизмов с образованием структурных и неструктурных белков, первые из которых образуют вирионы потомства, а последние играют важные регуляторные функции в ходе жизненного цикла вируса.

Основным способом контроля гриппозной инфекции является вакцинация. Тем не менее, особенности генома и механизмов репликации вируса гриппа дают возможность быстрого накопления мутаций. Это приводит к селекции вариантов, не соответствующих антителам, выработанным на исходный вирус после вакцинации. Такая способность приводит к ускользанию от специфического иммунного ответа, антигенному дрейфу вируса и объясняет, почему штаммовый состав вакцин требует ежегодного обновления [3]. Кроме того, существуют группы лиц с противопоказаниями к вакцинации, с недостаточно

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 197001 Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт им. Пастера

эффективным иммунным ответом. В этих случаях химиотерапия становится единственным способом как предотвращения заболевания конкретного человека, так и распространения гриппа в популяции в целом.

На сегодняшний день для терапии гриппа используются препараты трёх групп. Это препараты адамантанового ряда — ремантадин (а-метил-1-адамантил-метиламина гидрохлорид) и амантадин (1-аминоадамantan) [4]. Другой мишенью для лекарственного вмешательства является вирусная нейраминидаза — фермент, необходимый для нормального почкования вирусных частиц и проявления инфекционных свойств вируса гриппа, против которой эффективны нейраминидазные ингибиторы — занамивир (Реленза®), осельтамивир (Тамифлю®) [5], перамивир [6] и ланинамивир (Авиган®) [7]. В 2018 г. FDA одобрила новый препарат — балоксавир марбоксил (Ксофлюза®), ингибирующий полимеразный комплекс вируса гриппа [8]. В России и ряде других стран используется блокатор вирусного гемагглютини-на Арбидол® [9].

В отношении группы производных адамантана можно отметить сравнительно высокую токсичность, узкий спектр действия (препараты активны против гриппа А, но не против гриппа В) и быстрое формирование устойчивости вируса к препаратам. Для ингибиторов нейраминидазы характерны формирование резистентности вирусов и высокая стоимость синтеза, что делает эти препараты менее доступными для широкого использования. То же можно сказать и о балоксавире, устойчивость вируса к которому уже отмечена у детей [10].

Формирование резистентности вируса особенно быстро происходит на фоне профилактического или длительного терапевтического приёма химиопрепаратов лицами с ослабленной иммунной системой [11]. В этой связи для эффективной профилактики и лечения гриппа целесообразно применять препараты, непрямого действия, действующие опосредованно через систему врождённого иммунитета. Это создаёт неспецифический барьер для вируса на самых ранних стадиях инфекции, что позволяет предотвратить заболевание или облегчить его течение и сократить срок, а также избежать осложнений. Одним из подобных препаратов, широко применяемых в России и странах СНГ, является препарат Кагоцел® — сополимер природного полифенола госсипола с карбоксиметилцеллюлозой, индуцирующий выработку интерферонов [12].

Цель исследования — оценка протективной активности препарата Кагоцел на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции у лабораторных животных.

Материал и методы

Вирусы и клетки. В работе был использован вирус гриппа А/California/07/09 (H1N1)pdm09 из коллекции вирусных штаммов НИИЭМ им. Пастера. Вирус накапливали в аллантоисной полости 10–12-дневных куриных эмбрионов (птицефабрика «Скворицы» Ломоносовского р-на Ленинградской области) в течение 48 ч при 36°C. Титрование инфекционной активности вируса проводили в культуре клеток MDCK (ATCC CCL-34).

Животные. Белых беспородных мышей (самок) массой 16–18 г (возраст — 5–6 нед.) получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Субстанцию Кагоцела вводили перорально в объёме 0,2 мл один раз в день в дозе 24, 48 или 60 мг/кг/сут. в следующем режиме: за 24 ч и за 1 ч до инфицирования вирусом, через 1, 2, 3, 4 и 5 дней после заражения. В качестве препаратов сравнения использовали арбидол® и осельтамивира фосфат (Тамифлю®). Арбидол® использовали в дозировке 130 мг/кг/сут. по той же схеме, что и Кагоцел, Тамифлю вводили перорально в дозе 20 мг/кг/сут. один раз в день в течение 5 сут., начиная со дня инфицирования.

В каждую группу опыта включали 30 животных. На 3-и сутки после инфицирования по 10 животных из каждой группы умерщвляли, изолировали лёгкие и использовали для определения инфекционной активности вируса в ткани. Наблюдение за оставшимися животными осуществляли в течение 14 дней после инфицирования. Ежедневно фиксировали смертность животных в контрольных и опытных группах. На основании полученных данных в каждой группе рассчитывали процент смертности (отношение числа павших животных к общему числу заражённых животных в группе) и индекс защиты (отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе).

Титрование вируса. Для определения инфекционного титра вируса лёгкие животных гомогенизировали в десятикратном объёме стерильного физиологического фосфатного буфера и готовили из гомогенатов серию десятикратных разведений (10^{-1} – 10^{-6}) на том же буфере. При определении титра вируса использовали культуру клеток MDCK, выращенных на 96-луночных панелях на среде MEM. Клетки заражали серийными десятикратными разведениями гомогенатов от 10^{-1} до 10^{-7} и инкубировали в термостате в течение 96 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость (0,1 мл) переносили в лунки планшетов с круглым дном и добавляли равный объём 1% куриных эритроцитов. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение часа, после чего учитывали результаты гемагглютинации. На основании полученных данных при помощи метода Рида и Менча рассчитывали титр вируса, который выражали в десятичных логарифмах 50% тканевой цитотоксической инфекционной дозы ($\lg \text{TCID}_{50}$). О противовирусной активности соединений судили по снижению инфекционного титра вируса.

Анализ данных. Статистический анализ результатов проводили при помощи программы GraphPad Prism 2.0. Анализ выживаемости проводили путём построения кривых выживаемости с применением метода Каплана–Майера. Статистически значимые различия между группами определяли лог-ранговым тестом (Мантел–Кокс) с последующим попарным сравнением методом Гехана–Бреслоу–Вилкоксона. Сравнение показателей содержания титра вируса в лёгких осуществляли с использованием ANOVA и последующим попарным сравнением с применением критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Клинические признаки заболевания у инфицированных мышей были типичными для гриппозной инфекции. Они включали: затруднённое

Таблица 1. Показатели гибели животных в ходе летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в условиях применения химиопрепаратов

Препарат	Смертность, %	Индекс защиты, %	P
Кагоцел 24 мг/кг/сут.	15/20 (75%)	11,8	0,1620
Кагоцел 36 мг/кг/сут.	12/20 (55%)	35,3	0,0470
Кагоцел 60 мг/кг/сут.	9/20 (45%)	47,1	0,0007
Арбидол 130 мг/кг/сут.	8/20 (40%)	52,9	0,0004
Тамифлю 20 мг/кг/сут.	1/20 (5%)	94,1	<0,0001
Плацебо	17/20 (85%)	—	1,0000

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — различия с контрольной группой достоверны при уровне доверительной вероятности $p < 0,05$.

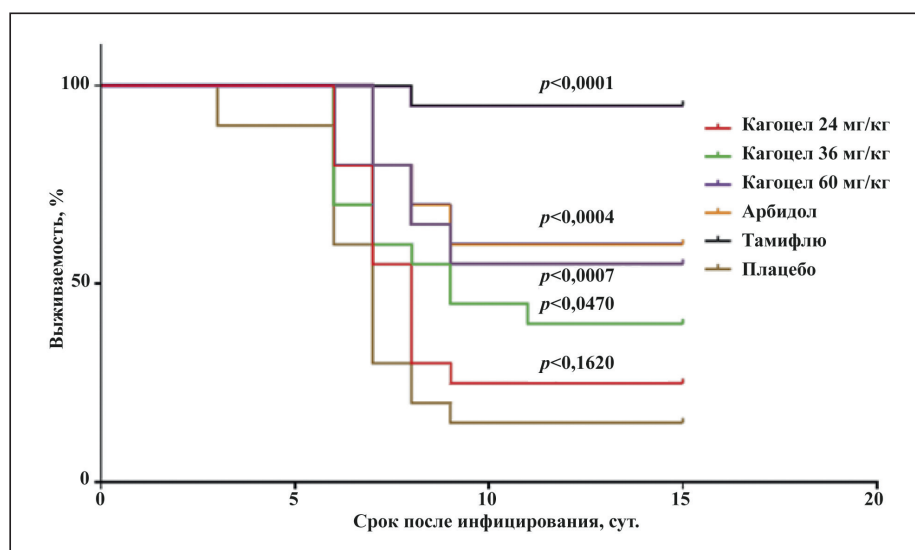
Таблица 2. Инфекционные титры вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в ткани лёгких мышей при гриппозной пневмонии в условиях применения химиопрепаратов

Препарат	Титр вируса в ткани лёгких, lg TCID ₅₀ /20 мг ($M \pm SE$, $n=10$)
Кагоцел 24 мг/кг/сут.	$5,6 \pm 0,2$ ($p=0,0426$)*
Кагоцел 36 мг/кг/сут.	$5,4 \pm 0,2$ ($p=0,0223$)*
Кагоцел 60 мг/кг/сут.	$5,3 \pm 0,3$ ($p=0,0276$)*
Арбидол 130 мг/кг/сут.	$5,1 \pm 0,3$ ($p=0,0036$)*
Тамифлю 20 мг/кг/сут.	$3,7 \pm 0,7$ ($p=0,0051$)*
Плацебо	$6,1 \pm 0,1$

дыхание, атаксию, тремор, а также снижение потребления корма и воды. Неспецифической смертности в контрольной группе интактных животных отмечено не было. Полученные данные по динамике смертности животных в контрольных и опытных группах суммированы в табл. 1 и представлены на рисунке.

Как видно из представленных данных, заражение мышей вирусом гриппа приводило к специфической смертности животных, начиная с 3-х суток после инфицирования. К 15-м суткам эксперимента гибель животных в контрольной группе (плацебо) составила 85%. Применение референс-препарата Тамифлю в дозе 20 мг/кг/сут приводило к снижению смертности до 5% (индекс защиты 94,1%, $p < 0,0001$), Арбидола в дозе 130 мг/кг/сут. — до 40% (ИЗ=52,9%, $p=0,0004$). На фоне введения Кагоцела во всех изученных дозах наблюдалось статистически значимое увеличение индекса защиты по сравнению с группой плацебо. Так, индекс защиты при введении Кагоцела в дозе 60 мг/кг/сут. составил 47,1% ($p=0,0007$), при дозе 36 мг/кг/сут. — 35,3% ($p=0,0470$). В дозировке 24 мг/кг/сут. препарат также проявлял протективную активность, однако отличия от группы плацебо при этом не достигали статистически достоверных величин.

Полученные данные были подтверждены при помощи изучения титров вируса в ткани лёгких

**Кривые Каплана-Мейера для анализа динамики гибели белых мышей в ходе летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 при использовании химиопрепаратов.**

животных. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Как следует из представленных результатов, использованный вирус гриппа эффективно размножался в лёгких лабораторных животных, достигая через 3 сут. после инфицирования инфекционного титра 6,1 lg TCID₅₀/20 мг. Использование препарата сравнения Тамифлю приводило к снижению инфекционной активности вируса на 2,4 порядка, что соответствует ранее полученным данным о чувствительности использованного вируса к осельтамивиру. Применение Арбидола также приводило к достоверному подавлению вирусной репродукции на 1,0 lg TCID₅₀. Кагоцел во всех исследованных дозах (60, 36 и 24 мг/кг/сут.), как и препараты сравнения, статистически досто-

кагоцел**РАБОТАЕТ****ДАЖЕ ПРИ ЗАПОЗДАЛОМ
ЛЕЧЕНИИ**

СОВРЕМЕННЫЙ ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ С 3 ЛЕТ

**ВЫБОР
СПЕЦИАЛИСТОВ¹****ПОМОГАЕТ**даже при запоздалом
начале лечения вплоть
до 4-го дня от начала
болезни²**УЛУЧШАЕТ**самочувствие
при гриппе и ОРВИ
уже в первые сутки
терапии!³**СНИЖАЕТ**вероятность развития
осложнений, требующих
назначения антибиотиков,
на 51%⁴

¹ По результатам голосования российских врачей в рамках премии Russian Pharma Awards 2019 Кагоцел – противовирусное средство №1 в России от гриппа и ОРВИ для взрослых и детей с 3 лет; по результатам голосования специалистов аптечной индустрии в рамках премии «Зеленый крест 2018» Кагоцел – препарат выбора для профилактики и лечения ОРВИ и гриппа. ² Инструкция по применению. ³ Кагоцел быстро улучшает самочувствие и достоверно сокращает выраженность и продолжительность клинических симптомов гриппа и ОРВИ уже в первые 24–36 часов от старта терапии вне зависимости от этиологии заболевания (Меркулова Л.Н., Колобухина Л.В. и др. Терапевтическая эффективность Кагоцела при лечении больных неосложненным гриппом и гриппом, осложненным ангиной // Клиническая фармакология и терапия. – 2002. – №11 (5). – С. 21–23; Малышев Н.А., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Ершов Ф.И. Современные подходы к повышению эффективности терапии и профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций // Consilium Medicum. – 2005. – Т. 7 (10). – С. 831–835). ⁴ По результатам наблюдательного международного исследования «Лечение ОРВИ и гриппа в рутинной клинической практике FLU-EE» с участием 18 946 пациентов из 262 медицинских центров России, Армении, Молдовы, Грузии применение противовирусного препарата Кагоцел показало снижение числа осложнений, требующих назначения антибиотикотерапии, на 51% (Фазылов В.Х. с соавт. Лечение ОРВИ и гриппа в рутинной клинической практике (результаты многоцентрового международного наблюдательного исследования FLU-EE) // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88, № 11).



Подробную информацию вы можете получить на сайте: www.kagocel.ru
ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА», 249030, Калужская обл., г. Обнинск, ул. Королева, д. 4, офис 402
Тел./факс: +7 (495) 741-49-89. Рег. уд. Р N002027/01 от 19.11.2007

Информация предназначена для медицинских и фармацевтических работников.

верно снижал активность вируса на 0,8; 0,7 и 0,5 порядка, соответственно.

В настоящем исследовании показано, что лечебно-профилактическое применение Кагоцела на модели летальной гриппозной пневмонии у мышей приводит к дозозависимому снижению специфической смертности и подавлению репродукции вируса в ткани лёгких. При этом эффект Кагоцела был статистически идентичен эффекту препарата сравнения — Арбидолу.

Основной механизм действия Кагоцела, как полимерного лекарства, реализуется в значительной мере за счёт воздействия на иммунные механизмы слизистой оболочки (СО) желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Кагоцел взаимодействует с иммунocyтaми СО ЖКТ, в которой сосредоточено около 70% иммунокомпетентных клеток тела человека. Противовирусное действие препарата Кагоцел не является прямым, так как точкой приложения препарата не являются белки вирусов. Противовирусное действие обусловлено способностью стимулировать и восстанавливать синтез собственных ИФН в условиях иммуносупрессивного действия различных вирусов. Эта особенность обеспечивает универсальность действия — способность подавлять развитие разных вирусов как возбудителей гриппа и острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) другой этиологии, так и вирусов герпеса [13]. Это приводит к развитию неспецифического противови-

ЛИТЕРАТУРА

1. Khanna M., Kumar P., Choudhary K., Kumar B., Vijayan V. K. Emerging influenza virus: a global threat. *J Biosci* 2008; 33: 475–482.
2. Patel K. K., Patel A. K., Shah S., Ranjan R., Shah S. V. Adult patient with novel H1N1 infection presented with encephalitis, rhabdomyolysis, pneumonia and polyneuropathy. *J Glob Infect Dis* 2012; 4, 178–181.
3. Osterhaus A., Fouchier R., Rimmelzwaan G. Towards universal influenza vaccines? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; 366 (1579): 2766–2773.
4. Scholtissek C., Quack G., Klenk H. D., Webster R. G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res* 1998; 37 (2): 83–95.
5. Colman P. M. A novel approach to antiviral therapy for influenza. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: Suppl B: 17–22.
6. Mancuso C. E., Gabay M. P., Steinke L. M., Vanosdol S. J. Peramivir: an intravenous neuraminidase inhibitor for the treatment of 2009 H1N1 influenza. *Ann Pharmacother* 2010; 44 (7–8): 1240–1249.
7. McKimm-Breschkin J. L. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses* 2013; 7: Suppl 1: 25–36.
8. Heo Y. A. Baloxavir: First Global Approval. *Drugs* 2018; 78 (6): 693–697.
9. Blaising J., Polyak S. J., Pêcheur E. I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral Res* 2014; 1: 107: 84–94.
10. Imai M., Yamashita M., Sakai-Tagawa Y., Iwatsuki-Horimoto K., Kiso M., Murakami J., Yasuhara A., Takada K., Ito M., Nakajima N., Takahashi K., Lopes T. J. S., Dutta J., Khan Z., Kriti D., van Bakel H., Tokita A., Hagiwara H., Izumida N., Kuroki H., Nishino T., Wada N., Koga M., Adachi E., Jubishi D., Hasegawa H., Kawaoka Y. Influenza A variants with reduced susceptibility to baloxavir isolated from Japanese patients are fit and transmit through respiratory droplets. *Nat Microbiol* 2019. doi: 10.1038/s41564-019-0609-0
11. Kossyvakis A., Mentis A. A., Tryfinopoulou K., Pogka V., Kalliaropoulos A., Antalis E., Lytras T., Meijer A., Tsiodras S., Karakitsos P., Mentis A. F. Antiviral susceptibility profile of influenza A viruses; keep an eye on immunocompromised patients under prolonged treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36 (2): 361–371.
12. Кондюрина Е. Г., Заплатников А. Л., Елкина Т. Н., Бурцева Е. И., Грибанова О. А., Пирожкова Н. И., Мингалимова Г. А., Тюленева И. О., русного ответа, препятствующего инфицированию и ранним стадиям распространения вируса в организме. Отсутствие этиологической специфичности такого ответа обуславливает активность Кагоцела в отношении многих возбудителей респираторных вирусных инфекций. Это отличает его от противовирусных препаратов прямого механизма действия, таких как Тамифлю, Реленза и др. Универсальность реакций врождённого иммунитета исключает также выработку резистентности вируса к препарату, поскольку его действие направлено не на вирусную мишень, а на стимуляцию неспецифических иммунных реакций организма.
13. Таким образом, в данном исследовании была показана высокая эффективность Кагоцела на экспериментальной модели летальной пневмонии у мышей, вызванной гриппозной вирусной инфекцией при использовании по лечебно-профилактической схеме. Полученные данные согласуются с ранее полученными результатами клинических исследований об эффективности применения Кагоцела как при профилактическом курсе, так и для лечения респираторных инфекций [14–25].
14. Следует отметить, что ранее полученные данные о повышении эффективности Кагоцела в комбинации с этиотропными средствами терапии гриппа в клинике позволяют прогнозировать подобные эффекты в исследованиях на животных [26].
15. Трушакова С. В., Мукашева Е. А. Многоплановая оценка схем терапии острых респираторных инфекций в условиях рутинной педиатрической практики. *Антибиотики и химиотер.* — 2016. — Т. 61. — № 5–6. — С. 8–20. / Kondjyurina E. G., Zaplatnikov A. L., Elkina T. N., Burtseva E. I., Gribanova O. A., Pirozhkova N. I., Mingalimova G. A., Tyuleneva I. O., Trushakova S. V., Mukasheva E. A. Mnogoplanovaya otsenka skhem terapii ostrykh respiratornykh infektsij v usloviyakh rutinnoy pediatricheskoj praktiki. *Antibiotiki i khimioter* 2016; 61: 5–6: 8–20. [in Russian]
16. Солозуб Т. В., Цветков В. В. Кагоцел в терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций: анализ и систематизация данных по результатам доклинических и клинических исследований. *Терапевтический архив.* — 2017. — Т. 89. — № 8. — С. 113–119. / Sologub T. V., Tsvetkov V. V. Kagotsel v terapii grippa i ostrykh respiratornykh virusnykh infektsij: analiz i sistematizatsiya dannykh po rezul'tatam doklinicheskikh i klinicheskikh issledovanij. *Terapevticheskij arkhiv* 2017; 89 (8): 113–119. [in Russian]
17. Тихонова Е. П., Кузьмина Т. Ю., Калинина Ю. С. Оценка профилактического эффекта индуктора поздних интерферонов в отношении острых респираторных вирусных инфекций у лиц молодого возраста. *Лечащий врач.* — 2018. — № 10. — С. 28–31. / Tikhonova E. P., Kuz'mina T. Ju., Kalinina Ju. S. Otsenka profilakticheskogo efekta induktora pozdnikh interferonov v otnoshenii ostrykh respiratornykh virusnykh infektsij u lits mladogo vozrasta. *Lechashchij vrach* 2018; 10: 28–31. [in Russian]
18. Ситников И. Г., Фазылов В. Х., Силина Е. В., Шевченко С. Б., Малышев Н. А., Еганын Г. А., Гроппа Л. Г. Корсантия Б. М. Влияние сроков начала терапии острой респираторной вирусной инфекции и гриппа на динамику клинических симптомов и исходы заболевания (результаты когортного международного наблюдательного исследования FLU-EE). *Клиническая медицина.* — 2017. — № 96 (7). — С. 634–641. / Sitnikov I. G., Fazylov V. Kh., Silina E. V., Shevchenko S. B., Malyshev N. A., Eganyan G. A., Groppa L. G. Korsantiya B. M. Vliyaniye srokov nachala terapii ostroj respiratornoj virusnoy infektsii i grippa na dinamiku klinicheskikh simptomov i iskhody zabolevaniya (rezul'taty kogortnogo mezhdunarodnogo nabljudatel'nogo issledovaniya FLU-EE). *Klinicheskaya meditsina* 2017; 96 (7): 634–641. [in Russian]
19. Малышев Н. А., Львов Н. И., Мальцев О. В. Оценка эффективности и безопасности комплексной терапии острых респираторных заболеваний аденовирусной этиологии у молодых лиц. *Лечащий Врач.* — 2018. — № 5. — С. 89–94. / Malyshev N. A., L'vov N. I., Mal'tsev O. V.

- Otsenka effektivnosti i bezopasnosti kompleksnoj terapii ostrykh respiratornykh zabolevanij adenovirusnoj etiologii u molodykh lits. *Lechashchij Vrach* 2018; 5: 89–94. [in Russian]
17. Петров В.А., Родионова Н.В., Малоков А.В. и др. Клинико-эпидемиологическая эффективность индуктора поздних интерферонов при профилактике ОРВИ и гриппа в предэпидемический период 2017–2018 года. *Лечащий Врач*. — 2018. — № 6. — С. 3–7. / Petrov V.A., Rodionova N.V., Maljukov A.V. i dr. Kliniko-epidemiologicheskaya effektivnost' induktora pozdnykh interferonov pri profilaktike ORVI i gripa v predepidemicheskij period 2017–2018 goda. *Lechashchij Vrach* 2018; 6: 3–7. [in Russian]
 18. Popov A.F., Shchelkanov M.Yu., Dmitrenko K.A., Simakova A.I. Combined therapy of influenza with antiviral drugs with a different mechanism of action in comparison with monotherapy. *J Pharm Sci Res* 2018; 10 (2): 357–360.
 19. Malyshev N.A., Lvov N.I., Maltsev O.V. Evaluation of the efficacy and safety of complex therapy of acute respiratory diseases of adenoviral etiology in young people. *World J Pharm Res* 2018; 7: 16: 1724–1733.
 20. Попов А.Ф., Симакова А.И., Дмитренко К.А., Щелканов М.Ю. Повышение противогриппозной эффективности Осельтамивира (Тамифлю®) и Умифеновира (Арбидола) путём сочетанного применения с Кагоцелом. *Антибиотики и химиотер.* — 2017. — Т. 62. — № 1–2. — С. 25–29. / Popov A.F., Simakova A.I., Dmitrenko K.A., Shchelkanov M.Yu. Povyshenie protivogrippoznoj effektivnosti Osel'tamivira (Tamiiflyu®) i Umifenovira (Arbidola) putem sochetannogo primeneniya s Kagotselom. *Antibiotiki i khimioter* 2017; 62: 1–2: 25–29. [in Russian]
 21. Шит С.М. Профилактика ОРВИ и гриппа индукторами интерферона у детей с аллергическими заболеваниями. *Conferința științifică CENTRUL MEDICAL «GALAXIA»*. 2018. — № 2 (67). — С. 24–28. / Shit S.M. Profilaktika ORVI i gripa induktorami interferona u detej s alergicheskimi zabolevaniyami. *Conferința științifică CENTRUL MEDICAL «GALAXIA»* 2018; 2 (67): 24–28. [in Russian]
 22. Зайцев А.А., Будорагин И.Е., Исаева Е.И. и др. Фармакотерапия острого бронхита: расставляем приоритеты. *Антибиотики и химиотер.* — 2019. — Т. 64. — № 1–2. — С. 44–49. / Zajtsev A.A., Budoragin I.E., Isaeva E.I. i dr. Farmakoterapiya ostrogo bronkhita: rasstavlyаем priority. *Antibiotiki i khimioter* 2019; 64: 1–2: 44–49. [in Russian]
 23. Попов А.Ф., Симакова А.И., Комарова И.А. Эффективность применения противовирусного препарата Кагоцел® в комплексном лечении вирусно-бактериальных пневмоний в условиях стационара. *Медицинский алфавит*. 2009. — Т. 9. — № 1. — С. 23–26. / Popov A.F., Simakova A.I., Komarova I.A. Effektivnost' primeneniya protivovirusnogo preparata Kagotsel® v kompleksnom lechenii virusno-bakterial'nykh pnevmonij v usloviyakh statsionara. *Meditinskij alfavit* 2009; 9: 1: 23–26. [in Russian]
 24. Силина Е.В., Ситников И.Г., Фазылов В.Х., Егания Г.А. Лечение острых респираторных вирусных инфекций и гриппа у пациентов с артериальной гипертензией. *Терапевтический архив*. — 2019. — № 9. — С. 53–61. / Silina E.V., Sitnikov I.G., Fazylov V.Kh., Eganyan G.A. Lechenie ostrykh respiratornykh virusnykh infektsij i gripa u patsientov s arterial'noj gipertenziej. *Terapevticheskij arkhiv* 2019; 9: 53–61. [in Russian]
 25. Ситников И.Г., Фазылов В.Х., Силина Е.В. Лечение гриппа и других ОРВИ у больных сахарным диабетом. *Терапевтический архив*. — 2019. — № 10. — С. 39–47. / Sitnikov I.G., Fazylov V.Kh., Silina E.V. Lechenie gripa i drugikh ORVI u bol'nykh sakharnym diabetom. *Terapevticheskij arkhiv* 2019; 10: 39–47. [in Russian]
 26. Попов А.Ф., Симакова А.И., Дмитренко К.А., Щелканов М.Ю. Повышение противогриппозной эффективности Осельтамивира (Тамифлю®) и Умифеновира (Арбидола) путём сочетанного применения с Кагоцелом. *Антибиотики и химиотер.* 2017. — Т. 62. — № 1–2. — С. 25–29. / Popov A.F., Simakova A.I., Dmitrenko K.A., Shchelkanov M.Yu. Povyshenie protivogrippoznoj effektivnosti Osel'tamivira (Tamiiflyu®) i Umifenovira (Arbidola) putem sochetannogo primeneniya s Kagotselom. *Antibiotiki i khimioter* 2017; 62: 1–2: 25–29. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Зарубаев Владимир Викторович — д. б. н., ст. н. с. лаб. экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Гаршинина Анжелика Валерьевна — н. с. лаб. экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Слита Александр Валентинович — к. б. н., ст. н. с. лаб. экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Беляевская Светлана Валентиновна — н. с. лаб. экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Лаврентьева Ирина Николаевна — д. м. н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Изучение эффективности Рибавирина® при экспериментальной форме тяжёлого острого респираторного синдрома

С. Я. ЛОГИНОВА, В. Н. ЩУКИНА, *С. В. БОРИСЕВИЧ, Р. А. ХАМИТОВ¹, В. А. МАКСИМОВ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, *Сергиев Посад*

¹ ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум»

Studying The Effectiveness of Ribavirin® in The Experimental Form of Severe Acute Respiratory Syndrome

S. YA. LOGINOVA, V. N. SHCHUKINA, *S. V. BORISEVICH, R. A. HAMITOV¹, V. A. MAKSIMOV

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

¹ ООО International Biotechnology Center «Generium»

Эффективность Рибавирина® оценивали по достоверности снижения тяжести течения заболевания и коэффициенту лечебного действия препаратов на пике патологического процесса, рассчитанных по следующим показателям: накоплению вируса в лёгких, снижению степени поражения лёгких, снижению выраженности изменений количественной и качественной характеристики белой крови, снижению выраженности изменений биохимических показателей крови. Рибавирин® наиболее эффективен при применении его по схеме экстренной профилактики в дозе 20 мг/кг (коэффициент лечебного действия 70%); в дозе 40 мг/кг — по лечебно-профилактической схеме (коэффициент лечебного действия 60%). Увеличение дозы Рибавирина® не способствовало повышению лечебной эффективности препарата.

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

The effectiveness of Ribavirin® was evaluated by the certainty of disease severity reduction and the coefficient of therapeutic action of drugs at the peak of the pathological process calculated by the following indicators: accumulation of the virus in the lungs, lung damage degree reduction, reduction observed in the severity of changes in the quantitative and qualitative characteristics of white blood, as well as the severity of changes in biochemical blood parameters. Ribavirin® is most effective when used according to the emergency prevention regimen at a dose of 20 mg/kg (therapeutic action coefficient — 70%); at a dose of 40 mg/kg according to the therapeutic and prophylactic regimen (therapeutic action coefficient — 60%). Increasing the dose of Ribavirin® did not contribute to the therapeutic effectiveness of the drug.

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

Введение

Тяжёлый острый респираторный синдром — коронавирусная инфекция, характеризующаяся скоротечным развитием заболевания. Болезнь начинается с повышения температуры, головной боли, слабости, в ряде случаев отмечены симптомы поражения верхних дыхательных путей [1, 2]. Анализ клинических показателей свидетельствует о том, что в течение первых дней заболевания часто выявляется лимфопения и тромбоцитопения, а также повышение ряда биохимических показателей в сыворотке крови больных (креатинфосфокиназа, лактатдегидрогеназа, аминотрансфераза) [2, 3].

Средства профилактики и терапии этого заболевания отсутствуют. Были попытки лечения па-

циентов с использованием антибиотиков (азитромицин, доксициклин, эритромицин, рифампицин, левофлоксацин и тетрациклин), а также с помощью многочисленных противовирусных препаратов (рибавирин, глюкокортикостероидные препараты, человеческие интерфероны) [4–9].

Таким образом, специалистами выявлен очень узкий круг эффективных лекарственных препаратов в отношении ТОРС на этапе доклинической оценки их эффективности (*in vitro*) [9–11]. В последние годы выявили ещё один коронавирус — возбудитель заболевания ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [12]. Поэтому актуальность поиска эффективных медицинских средств защиты населения РФ в отношении этого заболевания несомненна.

Материал и методы

Вирусы. В работе использовали вирус тяжёлого острого респираторного синдрома, штамм СоД, выделенный специалистами ВЦ НИИМ (ныне ФГБУ «48 Центральный научно-

исследовательский институт») из носоглоточного смыва больного ТОРС из Благовещенска [13]. Хранился при температуре минус $(70,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ в лиофилизированном виде.

Культура клеток. Использована перевиваемая культура клеток почек зелёных мартишек — Vero E6. В качестве среды поддержания использовали полусинтетическую среду (ПС-4) на растворе Хенкса, содержащую 2% сыворотки крупного рогатого скота, соответственно.

Исследуемый препарат. Рибавирин® — препарат (1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) производства Dragon Hwa ChemPharm Co. Limited, серия 20031110. Перед применением препарат растворяли в физиологическом растворе. Рибавирин вводили по схемам: профилактики, лечебно-профилактической, лечебной.

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

Токсичность исследуемых препаратов оценивали на неинфицированных сирийских хомяках.

Оценка противовирусной эффективности Рибавирина® осуществлена в соответствии с требованиями Руководства МЗ РФ [14].

Основными критериями оценки эффективности являлись показатели снижения уровня накопления вируса в лёгких (Δlg) и уровня лейкоцитоза, нормализация биохимических показателей крови (аланинаминотрансфераза — АлАТ, аспартатаминотрансфераза — АсАТ, креатинфосфокиназа — КФК, лактатдегидрогеназы — ЛДГ, мочевины и креатинина) и лейкограммы [15].

Результаты исследования

Основными показателями оценки эффективности Рибавирина® в отношении экспериментальной формы ТОРС у сирийских хомяков являлись: подавление накопления вируса в органе-мишени (лёгком), патологоанатомические изменения внутренних органов, биохимические показатели крови, влияние на динамику изменения суммарного пула лейкоцитов и лейкоцитарной формулы.

Результаты оценки противовирусной эффективности Рибавирина® показывают, что препарат в дозе, составляющей $1/4$ от равноэффективной для человека [3] (20 мг/кг, внутримышечно), наиболее эффективно подавляет размножение вируса в лёгких при применении его по схеме экстренной профилактики (+1,+24,+...+120 ч). В начальные

сроки после инфицирования концентрация вируса в лёгких составляла всего 1,0 lg БОЕ/мл и даже на пике инфекции подавление репродукции вируса было значительным — 2,4 lg. При двукратном введении Рибавирина® по профилактической схеме показано, что препарат активно подавляет репродукцию вируса в первые дни после инфицирования ($\Delta 1,9$ lg), далее его противовирусная эффективность значительно снижается. По-видимому, двукратного введения препарата в низкой концентрации недостаточно для купирования инфекции.

Введение Рибавирина® в исследуемой концентрации по лечебной схеме практически не подавляет репродукцию вируса ТОРС на протяжении всего срока наблюдения, лишь на пике инфекции отмечено незначительное снижение концентрации вируса в лёгких инфицированных животных ($\Delta 1,4$ lg).

Увеличение дозы препарата не способствовало более эффективному подавлению репродукции вируса в лёгких.

Патологоанатомическое обследование инфицированных и леченных сирийских хомяков показало, что при применении Рибавирина® внутримышечно в дозе 20 мг/кг по лечебно-профилактической и профилактической схемам в лёгких опытных групп так же, как и у контрольной группы животных, на 4-е сутки после заражения наблюдаются точечные очаги воспаления и кровоизлияния. В контрольной группе — практически у всех животных; при лечении — у 25%. На 6-е сутки — поражения лёгочной ткани у всех леченных животных были менее выражены, чем у контрольных сирийских хомяков. К 10-м суткам наблюдения поражения лёгких у леченных животных практически отсутствовали.

Следует отметить, что применение Рибавирина® в дозе 20 мг/кг в качестве монопрепарата по схеме профилактики и экстренной профилактики снижает тяжесть течения инфекции по показателю КФК (табл. 1). Лечебный эффект этого препарата по показателю КФК был гораздо менее выражен.

Значимую эффективность по нормализации показателя ЛДГ при экспериментальной инфекции ТОРС у сирийских хомяков выявил препарат

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

Схема применения препарата	Суточная доза препарата, мг/кг	Показатель	Активность препарата после инфицирования			
			2-е сутки	4-е сутки	6-е сутки	10-е сутки
-24,-1	20	Креатинфосфокиназа, $X \pm \sigma$, мккат/л	0,39 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,02
+1,+24,+...+120			0,45 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,01
+24,+...+144			1,03 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,06
Контроль (инфицированные)			1,27 $\pm$ 0,04	2,12 $\pm$ 0,03	1,16 $\pm$ 0,05	1,22 $\pm$ 0,02
Контроль (интактные)			0,44 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,04
-24,-1	20	Лактатдегидрогеназа, $X \pm \sigma$, МЕ/л	243 $\pm$ 9	1063 $\pm$ 18	707 $\pm$ 36	650 $\pm$ 22
+1,+24,+...+120			545 $\pm$ 15	1090 $\pm$ 20	714 $\pm$ 24	602 $\pm$ 14
+24,+...+144			1241 $\pm$ 12	961 $\pm$ 13	645 $\pm$ 15	577 $\pm$ 22
Контроль (инфицированные)			1915 $\pm$ 56	1447 $\pm$ 54	1805 $\pm$ 55	1803 $\pm$ 15
Контроль (интактные)			405 $\pm$ 32	402 $\pm$ 15	409 $\pm$ 13	399 $\pm$ 18

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

Схема применения препарата	Суточная доза препарата, мг/кг	Показатель	Активность препарата после инфицирования			
			2-е сутки	4-е сутки	6-е сутки	10-е сутки
-24,-1	20	Аланинамино- трансфераза, Х±σ, мкМ/(ч·л)	0,62±0,04	0,62±0,02	0,67±0,01	0,68±0,01
+1,+24,...+120			0,54±0,02	0,75±0,02	0,67±0,02	0,67±0,02
+24,...+144			1,04±0,09	1,10±0,06	0,83±0,01	0,81±0,02
-72,-48,-24,-1	40		0,91±0,02	0,85±0,09	0,88±0,02	Нд
-72,-48,-24,+2,+24,...+96			0,56±0,02	0,4±0,04	0,62±0,05	Нд
-72,-48,-24,-1			80	1,32±0,05	1,19±0,6	1,01±0,08
-72,-48,-24,+2,+24,...+96	1,15±0,04			0,85±0,07	0,95±0,05	Нд
Контроль (инфицированные)	1,44±0,18			2,53±0,05	2,01±0,03	2,32±0,04
Контроль (интактные)				0,65±0,08	0,66±0,08	0,69±0,05
-24,-1	20	Аспартатамино- трансфераза, Х±σ, мкМ/(ч·л)	0,93±0,03	0,72±0,02	0,53±0,01	0,60±0,02
+1,+24,...+120			0,78±0,02	0,90±0,03	0,52±0,06	0,59±0,01
+24,...+144			1,59±0,14	1,00±0,07	0,87±0,07	0,85±0,05
-72,-48,-24,-1	40		1,01±0,03	0,90±0,6	0,95±0,05	Нд
-72,-48,-24,+2,+24,...+96			0,54±0,05	0,25±0,02	0,66±0,06	Нд
-72,-48,-24,-1			80	1,54±0,09	1,15±0,,07	1,22±0,04
-72,-48,-24,+2,+24,...+96	0,75±0,02			0,31±0,06	0,54±0,05	Нд
Контроль (инфицированные)	2,14±0,09			2,62±0,04	1,85±0,06	2,23±0,07
Контроль (интактные)				0,71±0,09	0,73±0,09	0,71±0,06

Примечание. Нд — данные отсутствуют.

Рибавирин® при введении его внутримышечно при суточной дозе 20 мг/кг (см. табл. 1). Причём, нормализация ферментативной активности проходила при введении препарата как по профилактической схеме (введение препарата до инфицирования), так и схеме экстренной профилактики (введение препарата после инфицирования). Следует отметить, что активность ЛДГ в значительной степени снижалась даже при применении Рибавирина® по лечебной схеме.

Высокую эффективность в процессе нормализации показателя аминотрансфераз при экспериментальной инфекции ТОРС у сирийских хомяков выявил Рибавирин® при введении его внутримышечно (суточная доза 20 мг/кг).

При профилактике и экстренной профилактике экспериментальной инфекции ТОРС у сирийских хомяков Рибавирином® показатели активности аминотрансфераз соответствовали уровню таковых интактных животных (табл. 2). Следует отметить, что активность аминотрансфераз в значительной степени снижалась даже при применении Рибавирина® по лечебной схеме (в 2,5–3,0 раза). Вместе с тем, коэффициент де Ритиса при длительном применении Рибавирина® снижался, что свидетельствует о неблагоприятном состоянии печени. Это явление было характерно для неинфицированных животных, принимавших Рибавирин®. Следовательно, незначительное снижение коэффициента де Ритиса может быть вызвано токсическим влиянием самого препарата.

При профилактике и экстренной профилактике экспериментальной инфекции ТОРС у сирийских хомяков препаратом Рибавирин® показатели креатинина практически не отличались от таковых у интактных животных (табл. 3).

Исследования показали, что введение инфицированным животным Рибавирина® внутримышечно в дозе 20 мг/кг по профилактической и лечебно-профилактической схемам существенно снижает уровень мочевины в сыворотке крови сирийских хомяков. На пике инфекции концентрация мочевины в сыворотке леченных животных превышала таковой показатель для интактных животных всего в 1,4 раза и к 6-м суткам наблюдения соответствовала норме (см. табл. 3). При применении Рибавирина® по лечебной схеме этот показатель был значительно выше нормы, статистически достоверно ниже, чем у нелеченных животных.

При использовании Рибавирина® (20 мг/кг) по профилактической схеме в начальной фазе заболевания наблюдали лейкопению, которая на пике инфекции сменялась лейкоцитозом и к терминальной фазе наблюдения практически соответствовала норме. Как правило, у животных при воспалении лёгких начальный период болезни характеризуется лейкопенией, при осложнениях — лейкоцитозом [16]. Полученные данные по определению количества лейкоцитов в крови животных опытных и контрольных групп хорошо согласуются с результатами патологоанатомического обследования сирийских хомяков.

Следует отметить, что по степени выраженности лейкоцитоза можно судить о реактивности организма при воспалительных процессах. Выраженный лейкоцитоз свидетельствует, как правило, о хорошей реактивной способности организма. Однако и при значительных лейкоцитозах не всегда прогноз может быть благоприятным, так как состояние жизненно важных органов и систем может быть неудовлетворительным. Поэтому наряду с определением количества лейкоцитов

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

Схема применения препарата	Суточная доза препарата, мг/кг	Показатель	Активность препарата после инфицирования			
			2-е сутки	4-е сутки	6-е сутки	10-е сутки
-24,-1	20	Креатинин, мкМ/л, $X \pm \sigma_x$	179,1±0,1	193,8±0,6	191,0±0,2	189,2±0,3
+1,+24,+...+120			183,0±0,2	190,4±0,4	180,4±0,4	179,6±0,2
+24,+...+144			221,0±0,9	201,4±1,2	220,0±0,2	189,9±0,6
-72,-48,-24,-1	40		177,2±1,1	164,9±0,8	188,2±0,6	Нд
-72,-48,-24,+2,+24,...+96			165,2±0,2	166,6±0,6	191,2±0,5	Нд
-72,-48,-24,-1	80		174,3±0,9	171,1±0,6	187,1±0,4	Нд
-72,-48,-24,+2,+24,...+96			159,6±0,6	166,4±0,4	169,4±0,9	Нд
Контроль (инфицированные)			210,0±1,0	255,7±1,0	247,9±0,3	213,5±0,5
Контроль (интактные)				184,5±0,4	181,2±0,8	180,2±0,2
-24,-1	20	Мочевина, мм/л, $X \pm \sigma_x$	4,1±0,3	7,8±0,2	6,4±0,3	6,0±0,2
+1,+24,+...+120			5,6±0,2	7,7±0,4	6,5±0,3	6,3±0,3
+24,+...+144			8,4±0,2	7,9±0,4	8,8±0,6	7,9±0,6
-72,-48,-24,-1	40		7,9±0,3	8,7±0,3	8,2±0,5	Нд
-72,-48,-24,+2,+24,...+96			7,7±0,2	7,0±0,5	7,4±0,6	Нд
-72,-48,-24,-1	80		8,8±0,4	9,2±0,4	9,6±0,2	Нд
-72,-48,-24,+2,+24,...+96			7,6±0,2	7,5±0,5	7,0±0,3	Нд
Контроль (инфицированные)			8,5±0,2	9,1±0,6	10,8±0,3	11,8±0,4
Контроль (интактные)				5,9±0,1	5,4±0,3	5,6±0,1

Примечание. Нд — данные отсутствуют.

уделяют большое внимание соотношению различных групп клеток в лейкоцитарном пуле — лейкоцитарной формуле крови.

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

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

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

При применении Рибавирина® (20 мг/кг) по профилактической схеме было отмечено угнетение гранулопоэза и увеличение количества лим-

фоцитов на ранней стадии заболевания (4–6-е сутки после заражения). К 10-м суткам наблюдали значительное увеличение количества нейтрофилов (ИС=1,05) и снижение лимфоцитарной фракции, что свидетельствует о значительном снижении тяжести заболевания. При экстренной профилактике ТОРС у сирийских хомяков препаратом Рибавирин® отмечено угнетение гранулоцитарной фракции лейкоцитов, значительное увеличение количества лимфоцитов в ранний период после инфицирования. В более поздние сроки увеличение количества нейтрофилов как палочкоядерных, так и сегментоядерных, при этом значение ИС составляло 0,52. При лечебном применении препарата Рибавирин® отмечены незначительные колебания нейтрофилов, увеличение количества лимфоцитов. Следует отметить, что лимфоцитоз, как правило, наступает в период выздоровления. Постинфекционный лимфоцитоз, по видимому, связан с повышением функции лимфатической системы или, правильнее сказать, с понижением функции миелоидной системы.

У больных ТОРС с 3 по 14-е сутки заболевания отмечено значительное повышение уровня цитокина — фактора некроза опухоли [1–3]. Были проведены эксперименты по оценке уровня ФНО в сыворотках крови леченых и интактных сирийских хомяков. В связи с отсутствием тест-наборов для оценки уровня ФНО, специфичных для сирийских хомяков, нами были использованы наборы, предназначенные для оценки уровня этого цитокина в сыворотке крови человека. Уровень ФНО в сыворотке здорового человека составил 18 пкг/мл (норма — не выше 50 пкг/мл), у интактных сирийских хомяков — 2 пкг/мл.

У сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, уровень ФНО в сыво-

Таблица 4. Влияние Рибавирина® на динамику изменения креатинина и мочевины в сыворотке крови сирийских хомяков, перорально инфицированных вирусом ТОРС, штамм СоД

Суточная доза препарата	Схема применения препарата	Анализ тяжести течения инфекционного процесса				
		на пике инфекции			в течении всего срока наблюдения	
		сумма баллов	индекс тяжести заболевания	коэффициент лечебного действия, %	значение критерия знаков	уровень значимости лечебной эффективности препарата, <i>p</i>
20 мг/кг	-24 ч, -1 ч	18	0,450	55,0	9/10	0,05
	+1, +24, +...+96	12	0,300	70,0	10/10	0,01
	+24, +...+96	21	0,525	47,5	8/10	Доо
40 мг/кг	-72, -48, -24, -2	20	0,500	50,0	9/10	0,05
	-72, -48, -24, +2, +24, +...+96	16	0,400	60,0	9/10	0,05
80 мг/кг	-72, -48, -24, -2	22	0,550	45,0	8/10	Доо
	-72, -48, -24, +2, +24, +...+96	20	0,500	50,0	9/10	0,05
Контроль (инфицированные)	—	40	1,000	—	0/1	—

Примечание. Доо — достоверные отличия отсутствуют.

ротке крови колебался от 26 до 41 пкг /мл. При использовании Рибавирина® по схемам профилактики и лечения не выявлено существенных различий уровня ФНО в сыворотке крови опытных и контрольных групп животных. При применении препарата по схеме экстренной профилактики отмечено снижение уровня ФНО в 2 раза.

Полученные данные свидетельствуют о более высоком уровне ФНО в сыворотке крови сирийских хомяков, инфицированных вирусом ТОРС, по сравнению с интактными и лечеными животными.

Для анализа влияния исследуемых препаратов на тяжесть течения заболевания ТОРС у экспериментальных животных провели рейтинговую оценку степени выраженности следующих показателей: уровень накопления вируса в лёгких; степень патологоанатомических изменений внутренних органов; количество лейкоцитов; изменения в лейкоцитарной формуле крови; изменение

ферментативной активности КФК, ЛДГ, АсАТ, АлАТ; изменение концентрации мочевины и креатинина. Максимальная выраженность каждого из указанных признаков на пике инфекции (4–6 сут) оценивалась в 4 балла [3].

Применение Рибавирина® в дозе 20 мг/кг по профилактической схеме с вероятностью 95% снижает тяжесть заболевания на 55%; по схеме экстренной профилактики — с вероятностью 99% на 70% (табл. 4). Увеличение дозы Рибавирина® не способствовало повышению протективной эффективности препарата.

Препарат может быть рекомендован для применения в качестве эффективного препарата этиотропной терапии в начальной фазе развития тяжёлого респираторного синдрома.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

- Booth C.M., Matukas L.M., Tomlinson G.A. et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the Greater Toronto Area. *JAMA* 2003; 289 (21): 2801–2809.
- Tsang K.W., Ho P.L., Oi G.C. et al. Cluster of cases of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. *New Engl Med* 2003; 348 (20): 1977–1985.
- Liu Z.Y., Li T.S., Wang Z. et al. Clinical features and therapy of 106 cases of severe acute respiratory syndrome. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2003; 42: 373–377.
- Hensley L., Fritz E., Jahrling P. et al. Interferon- β 1a and SARS coronavirus replication. *Emerg Infect Dis* 2004; 10 (2): 317–319.
- Koren G., King S., Knowles S., Phillips E. Ribavirin in treatment of SARS: A new Trick for an old drug? *Can Med Ass J* 2003; 168 (10): 1231.
- Pak C., Lam C., Li A. et al. Inflammatory cytokine profile in children with severe acute respiratory syndrome. *Pediatrics* 2004; 113 (1): 7–14.
- Tan E.L.C., Ooi E.E., Tan H.C. et al. Inhibition of SARS Coronavirus infection in vitro with clinical approved antiviral drugs. *Emerg Infect Dis* [serial online] 2004 Apr [cited 2004 February 24]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no4/03-0458.htm>
- Zhao Z., Zhang F., Xu M. et al. Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol* 2003; 52: 715–20.
- Zhaori G. Antiviral treatment of SARS: Can we draw any conclusions? *CMAJ* 2003; 169: 11.
- Логонова С.Я., Фалдина В.Н., Борисевич С.В. и др. Изучение эффективности лекарственных препаратов в отношении вируса тяжёлого острого респираторного синдрома *in vitro*. Материалы

- конференции, посвящённой 70-летию Противочумного центра «Противочумные учреждения России и их роль в обеспечении эпидемиологического благополучия населения страны», М.: 2004. — С. 213. / Loginova S.Ja., Faldina V.N., Borisevich S.V. i dr. Izuchenie jeffektivnosti lekarstvennyh preparatov v otnoshenii virusa tjazhelogo ostrogo respiratornogo sindroma *in vitro*. Materialu konferentsii., posvjashhennoj 70-letiju Protivochumnogo centra «Protivochumnye uchrezhdenija Rossii i ih rol' v obespechenii jepidemiologicheskogo blagopoluchija naselenija strany». Moskva, 2004; 213. [in Russian]
- Логонова С.Я., Степанова В.Н., Борисевич С.В. и др. Противовирусная эффективность индукторов интерферона и рибавирина в отношении экспериментальной формы тяжёлого острого респираторного синдрома. Тезисы докл. «XII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», посвящённый 60-летию победы в Великой отечественной войне 1941–1945 гг. 18–22 апреля 2005 г., Москва. М.: 2005. — С.171. / Loginova S.Ja., Stepanova V.N., Borisevich S.V. i dr. Protivovirusnaja jeffektivnost' induktorov interferona i ribavirina v otnoshenii jeksperimental'noj formy tjazhelogo ostrogo respiratornogo sindroma. Tezisy dokladov «HII Rossijskij nacional'nyj kongress «Chelovek i lekarstvo», posvjashhennyj 60-letiju pobedy v Velikoj otechestvennoj vojne 1941–1945 gg. 18–22 aprelja 2005g., Moskva. Moskva, 2005; 171. [in Russian]
- Жуматов К.Х., Кыдырманов А.И. Ближневосточный респираторный синдром (MERS- Middle East Respiratory Syndrome): новая коронавирусная инфекция человека и животных. Биотехнология. Теория и практика. — 2015. — № 3. — С. 4–10. / Zhumatov K.H., Kydyrmanov A.I. Blizhnevostochnyj respiratornyj sindrom (MERS- Middle East Respiratory Syndrome): novaja koronavirusnaja infekcija cheloveka i zhivotnyh. Biotehnologija. Teorija i praktika 2015; 3: 4–10. [in Russian]

13. Сыромятникова С.И., Марков В.И., Максимов В.А., Степанов Н.Н., Борисевич С.В., Меркулов В.А., Васильев Н.Т., Онищенко Г.Г., Писцов М.Н. Штамм СоД вируса тяжёлого острого респираторного синдрома рода *Coronavirus*, предназначенный для разработки средств и методов биологической защиты. Патент РФ № 2263144, 27.10.2005. / Syromjatnikova S.I., Markov V.I., Maksimov V.A., Stepanov N.N., Borisevich S.V., Merkulov V.A., Vasil'ev N.T., Onishhenko G.G., Piscov M.N. Shtamm SoD virusa tjazhelogo ostrogo respiratornogo sindroma roda *Coronavirus*, prednaznachennyj dlja razrabotki sredstv i metodov biologicheskoy zashhity. Patent RF № 2263144, 27.10.2005. [in Russian]
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 2. М.: Минздрав РФ, 2013. / Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast' 2. M., Minzdrav RF, 2013. [in Russian]
15. Борисевич С.В., Логинова С.Я., Хамитов Р.А., Максимов В.А., Фалдина В.Н., Сыромятникова С.И. Способ моделирования тяжёлого острого респираторного синдрома у экспериментальных животных. Патент РФ №2280288, 20.07.2006. / Borisevich S.V., Loginova S.Ja., Hamitov R.A., Maksimov V.A., Faldina V.N., Syromjatnikova S.I. Sposob modelirovanija tjazhelogo ostrogo respiratornogo sindroma u jeksperimental'nyh zhivotnyh. Patent RF №2280288, 20.07.2006. [in Russian]
16. Синопальников А.И., Воробьев А.В. Тяжёлый острый респираторный синдром: новые фрагменты головоломки. Клин микробиол антимикроб химиотер. — 2004. — Т. 6. — № 2. — С. 108–123. / Sinopalnikov A.I., Vorob'ev A.V. Tyazhely'j ostryy'j respiratorny'j sindrom: novy'e fragmenty' golovolomki. Klin mikrobiol antimikrob ximioter 2004; 6 (№ 2): 108–123. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Логинова Светлана Яковлевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

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

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

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

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

Максимов Владимир Алексеевич — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник, профессор, ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Формирование персистеров у клинических изолятов *K.pneumoniae*, индуцированных меропенемом, амикацином и их комбинацией

*Н. Н. МАРКЕЛОВА^{1,2}, А. В. ТУТЕЛЬЯН^{1,3}, Н. Г. СЕДЫХ¹

¹ ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

² ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» МЗ РФ, Москва

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова МЗ РФ, Москва

Formation of Persisters in Clinical Isolates of *K.pneumoniae* Induced with Meropenem, Amikacin, and Their Combination

*N. N. MARKELOVA^{1,2}, A. V. TUTELYAN^{1,3}, N. G. SEDYKH¹

¹ Science Central Institute of Epidemiology of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, Moscow

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

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

Исследование индуцированной антибиотикотолерантности чувствительных к меропенему и амикацину клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* выявило формирование у них фенотипически гетерогенных персистеров, представленных SCV (small colony variant) и NCV (normal colony variant) формами. Корреляции образования персистеров между данными антимикробными препаратами не обнаружено ($R=-0,37$), что указывает на различные механизмы толерантности к антибиотикам. Способность амикацина индуцировать образование SCV-персистеров была выше, чем у меропенема ($p<0,05$), и снижению их количества способствовал синергетический эффект обоих препаратов, максимально — до 80,0%. При этом SCV-персистеры *K.pneumoniae* характеризовались кратковременным повышением адаптивной устойчивости к антибиотикам, которые были использованы в качестве индукторов образования персистирующих фракций бактерий ($p<0,05$), что может способствовать их более эффективному выживанию в средах с антибиотиками.

Ключевые слова: антибиотикотолерантность, персистеры, фенотипическая гетерогенность, SCV (вариант малой колонии).

A study of induced antibiotic tolerance of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* sensitive to meropenem and amikacin revealed the formation of phenotypically heterogeneous persisters in them, represented by the SCV (small colony variant) and NCV (normal colony variant) forms. There was no correlation of persister formation between these antimicrobial drugs ($R=-0.37$), which indicates different mechanisms of tolerance to antibiotics. The ability of amikacin to induce the formation of SCV persisters was higher than that of meropenem ($p\text{-level} > 0.05$), and the synergistic effect of both drugs contributed to a decrease in their number, to a maximum of 80.0%. At the same time, SCV-persisters of *K.pneumoniae* were characterized by a short-term increase in adaptive resistance to antibiotics, which were used as inducers of the formation of persistent bacterium fractions ($p\text{-level} > 0.05$), which may contribute to their more effective survival in media with antibiotics.

Keywords: antibiotic tolerance, persisters, phenotypic heterogeneity, SCV (small colony variant).

Введение

Толерантность к антибиотикам на сегодняшний день описана у *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* и других видов микроорганизмов, и её роль в персистенции инфекций в последние годы получила признание [1–5]. В отличие от генетической устойчивости бактерий к антибиотикам, когда бактерии способны расти в присутствии бактерицидных концентраций антибиотиков, то-

лерантность — это способность генетически восприимчивых к антибиотикам популяций бактерий выживать в этих же условиях в результате образования персистеров [6].

Субпопуляции персистеров при прекращении действия антибиотиков возобновляют рост, восстанавливая популяцию, сохраняя первоначальную чувствительность к антибиотикам [1, 7]. Персистеры являются важным компонентом биоплёнок, образуемых патогенами, что в значительной степени способствует их толерантности к противомикробным препаратам [8, 9]. Часть субпопуляции персистеров может быть представлена вариантами небольших колоний, так называемыми SCV (small colony variants) — формами, которые наиболее час-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: E-mail: sedykhnatali@yandex.ru

то ассоциируются с хроническими и рецидивирующими инфекциями [10]. Частота встречаемости SCV в бактериальной популяции увеличивается после воздействия различных стрессовых условий, например, изменения кислотности среды или присутствия антибиотиков [11–13]. SCV-формы найдены у различных видов *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Burkholderia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* и др., но существуют трудности их выявления в клинических образцах и изучения их свойств из-за нестабильности большинства SCV, подверженных фенотипическому переключению с возвратом к обычному фенотипу нормальных колоний [10, 14, 15].

Несмотря на активные исследования закономерностей образования персистеров в бактериальной популяции, слабо изученным остаётся влияние различных антибиотиков и их комбинаций, как на формирование, так и на искоренение персистирующих форм бактериальных клеток, включая SCV. Оценка индуцированной антибиотиками толерантности к антимикробным препаратам в отношении гетерогенных бактериальных популяций клинических изолятов может способствовать выявлению наиболее эффективных препаратов и/или их комбинаций в терапии инфекций.

Цель работы — исследовать особенности формирования персистеров *Klebsiella pneumoniae*, индуцированных высокими бактерицидными концентрациями антибиотиков, и оценить эффективность синергетической комбинации меропенема с амикацином в элиминации персистеров из бактериальных популяций.

Материал и методы

В качестве объектов изучения из коллекции культур лаборатории ИСМП ЦНИИ эпидемиологии были отобраны 18 изолятов *K. pneumoniae*, чувствительных к меропенему и амикацину. Культуры бактерий выращивали на агаре Лурия–Бертани (ЛБ) в течение 24 ч. Из приготовленных суспензий культур ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) готовили ряд разведений и высевали на агар Мюллера–Хинтона (МХ) для подсчёта колоний в 1 мл суспензии. В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора антибиотика и бактериальной суспензии. Рабочие растворы антибиотиков соответствовали концентрациям, превышающим минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотика в 100 раз (меропенем 3,0–200,0 мкг/мл; амикацин 25,0–800,0 мкг/мл). Инокулированные в 3 повторностях образцы инкубировали 6 ч при 37 °C и непрерывном встряхивании. По окончании инкубации из каждой экспериментальной лунки высевали по 1 мкл инокулята на плотную питательную среду МХ. Посевы культивировали 24 ч при 37 °C и подсчитывали КОЕ (колониеобразующие единицы) выживших бактериальных популяций. МИК антибиотиков определяли микрометодом в жидкой питательной среде МХ [16]. Интерпретация результатов чувствительности к антибиотикам проводилась в соответствии с рекомендациями EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [17].

Определение кинетических параметров роста осуществляли с помощью программы «Микроб-автомат» на базе планшетного фотометра «Multiscan Ascent». В лунки стандартного 96-луночного планшета вносили суспензию бактериальных культур и бульон МХ в равных объёмах, измерение проводи-

лось в трёх повторностях. Температура инкубации составила 37,0 °C. Динамическое измерение оптической плотности в ячейках планшета происходило через каждые 3 мин при длине волны фотометрирования 620 нм, и непрерывном встряхивании; количество измерений составляло 220. Результатом обработки кривых роста бактерий являлось соотношение площади под кривой приращений оптических плотностей в опытных лунках к соответствующей площади в контрольных лунках, выданное в процентах [18].

Обработку данных и статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программ Statistica 13. Процент диссоциации культур по размеру колоний подсчитывали как отношение количества изменённых колоний к общему количеству колоний. Корреляции определяли с помощью коэффициента Спирмена для признаков, характеризующихся отличным от нормального распределением. Сравнение изменений признаков проводили с помощью непараметрического *W*-критерия [19].

Результаты исследования

Исследуемые клинические изоляты *K. pneumoniae*, чувствительные к меропенему (МИК в диапазоне от 0,03 до 2 мкг/мл) и амикацину (МИК в диапазоне от 0,25 до 8 мкг / мл), после воздействия этих препаратов на культуры *in vitro* в дозах, превышающих значения МИК в 100 раз, полностью не погибали, оставляя жизнеспособную популяцию клеток, состоящую из двух фенотипов колоний: SCV (1/10 от обычного размера) и NCV (normal colony variant). Применив в эксперименте комбинацию антимикробных препаратов меропенема и амикацина, обладающих синергетическим эффектом, возникло предположение, что их сочетание может эффективно искоренять гетерогенные популяции АТ клеток, полученных после воздействия антибиотиков.

В зависимости от применяемого антибиотика и их сочетания формирование АТ фракций популяций *K. pneumoniae* происходило с различной интенсивностью. Изоляты были сгруппированы в 4 группы в соответствии с долей персистеров в популяции после воздействия меропенема, амикацина и их комбинации. Фракции персистеров большинства изолятов составляли менее чем 0,26% от общей популяции для меропенема, 0,36% — для амикацина, 0,35% — для комбинации меропенема с амикацином (рис. 1).

Между численностью популяций выживших клеток при воздействии антибиотиков меропенема и амикацина с отличающимися механизмами действия корреляции не обнаружено ($R = -0,37$), следовательно, в основе внутреннего контроля их фенотипа лежат различные механизмы, что контрастирует с явлением множественной лекарственной толерантности (МЛТ). Состояние МЛТ неоднократно описано исследователями, при этом предполагалось, что связано оно с состоянием покая бактериальных клеток и может достигаться с помощью перекрестных эффектов, вызванных разными антимикробными препаратами [20, 21]. Отсутствие корреляции образования АТ популяций бактерий, между противомикробными препара-



Рис. 1. Распределение частот персистирующих фракций *K.pneumoniae*, полученных в результате воздействия высоких доз антибиотиков.

ратами, даже с похожими механизмами действия, такими как ципрофлоксацин и налидиксовая кислота, подтверждаются другими авторами [22]. Что касается величины образования персистеров в результате воздействия комбинации антибиотиков, то наблюдались корреляция ($R=0,77$; $p<0,05$) между персистерами, индуцированными амикацином, с одной стороны, и персистерами, индуцированными сочетанием меропенема и амикацина, — с другой, и отсутствие корреляции между персистерами, индуцированными меропенемом и обоими антибиотиками ($R=0,22$), что указывает на преобладающую способность амикацина в данной комбинации антибактериальных препаратов стимулировать персистенцию в клинических изолятах.

В условиях экспериментального антибиотического стресса, когда большинство изолятов отвечает образованием АТ популяций, у 4 изолятов

K.pneumoniae получить АТ популяции к амикацину не удалось. Их отсутствие может характеризовать дикие популяции бактерий, для которых появление толерантности к антибиотикам не является критически важным в обеспечении жизнеспособности бактерий, в отличие от изолятов внутрибольничного происхождения из среды с постоянным селективным давлением, налагаемым антибактериальной терапией [22, 23].

В составе общих фракций персистеров *K.pneumoniae* были выявлены SCV-персистеры, которые составляли меньшую часть от общего числа выживших субпопуляций бактерий. Разнообразие в интенсивности проявления фенотипа SCV-персистеров, индуцированных меропенемом, амикацином и их комбинацией между изолятами, может указывать на дифференциальную способность антибиотиков стимулировать образование

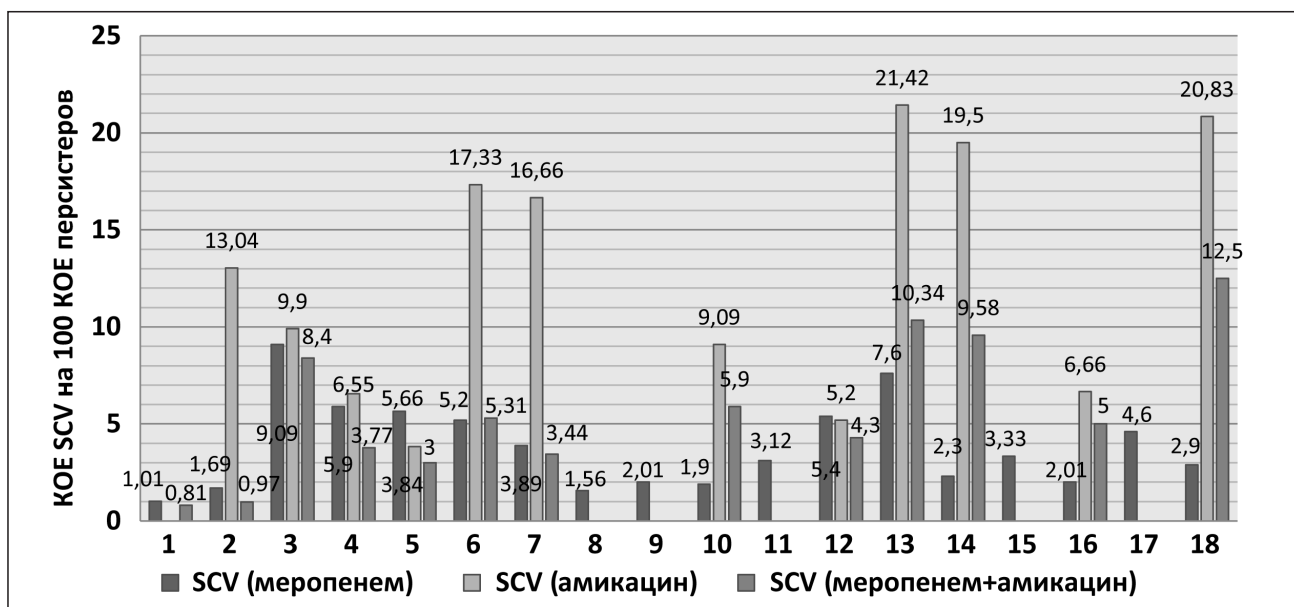


Рис. 2. Образование SCV-персистеров в составе персистирующих фракций 18 изолятов *K.pneumoniae* под влиянием меропенема — SCV (меропенем), амикацина — SCV (амикацин), их комбинации — SCV (меропенем+амикацин).

SCV-форм. При обработке бактерий амикацином субпопуляции SCV относительно популяций персистеров значительно превышали SCV, выявленных при обработке меропенемом ($p=0,04$), при этом совместное действие этих антибиотиков достоверно снижало SCV (минимум — 17,5%, максимум — 80,0%) только по отношению к SCV, индуцированных амикацином ($p=0,001$), но не меропенемом ($p=0,61$) (рис. 2).

Фенотип SCV в 100,0% случаев оказался нестабилен, и при пересеве через 24 ч происходило фенотипическое переключение на колонии нормального размера. Основным признаком переключения стало восстановление морфологии колоний. Анализ кинетических моделей роста SCV и NCV показал, что рост ревертантов SCV составлял 94,0–144,0% от роста NCV, принятого за 100,0%, что отличает их от стабильных SCV, рост которых характеризуется медленными темпами за счёт мутаций. Небольшой размер колоний нестабильных SCV может быть следствием более позднего начала роста и отсроченной инициации клеточного деления бактерии [24].

Выявленные после воздействия высоких концентраций антибиотиков SCV-персистеры *K.pneumoniae* после однократного пересева показали уменьшение зон ингибирования антибиотиками в сравнении с исходными изолятами: в отношении SCV(м), индуцированных меропенемом, наблюдалось снижение чувствительности к меропенему ($p=0,005$), SCV(а), индуцированных амикацином, — к амикацину ($p=0,002$) и не наблюдалось к амикацину ($p=0,57$) и меропенему ($p=0,06$), соответственно; в отношении SCV(м+а), индуцированных

комбинацией меропенема с амикацином, чувствительность снизилась и к меропенему ($p=0,001$) и к амикацину ($p=0,001$) (рис. 3).

В ряде случаев отмечался переход в категорию умереннорезистентного фенотипа у SCV(м) — 2 из 15, SCV(а) — 6 из 10, SCV(м+а) — 9 из 10 в отношении амикацина, а в отношении меропенема — только у SCV(м+а) — 1 из 10. Следует отметить, что исходные изоляты *K.pneumoniae* через 48 ч культивирования образовывали мелкие колонии в зоне ингибирования меропенемом. Появление подобных колоний может быть связано как с образованием субпопуляций с гетерогенной экспрессией устойчивости, которые в свою очередь способны проявлять гетерорезистентность — повышенную устойчивость к антибиотикам, так и со способностью персистировать в латентном состоянии в присутствии противомикробных препаратов на фоне чувствительной популяции, [25]. Сниженная чувствительность к антибиотикам при последующих пассажах SCV сохранилась только у SCV(м) к меропенему, произошедших от 3 исходных изолятов, которые относились к категории NWT (non-wild-type), то есть к микробиологически устойчивым, и были гетерорезистентными в отношении меропенема. Во всех остальных случаях SCV можно считать персистирующими формами, показавшими временное адаптивное повышение устойчивости к антибиотикам, и при последующих пассажах воосстановившими чувствительность исходных изолятов, которые в соответствии с критериями эпидемиологических точек отсечения EUCAST

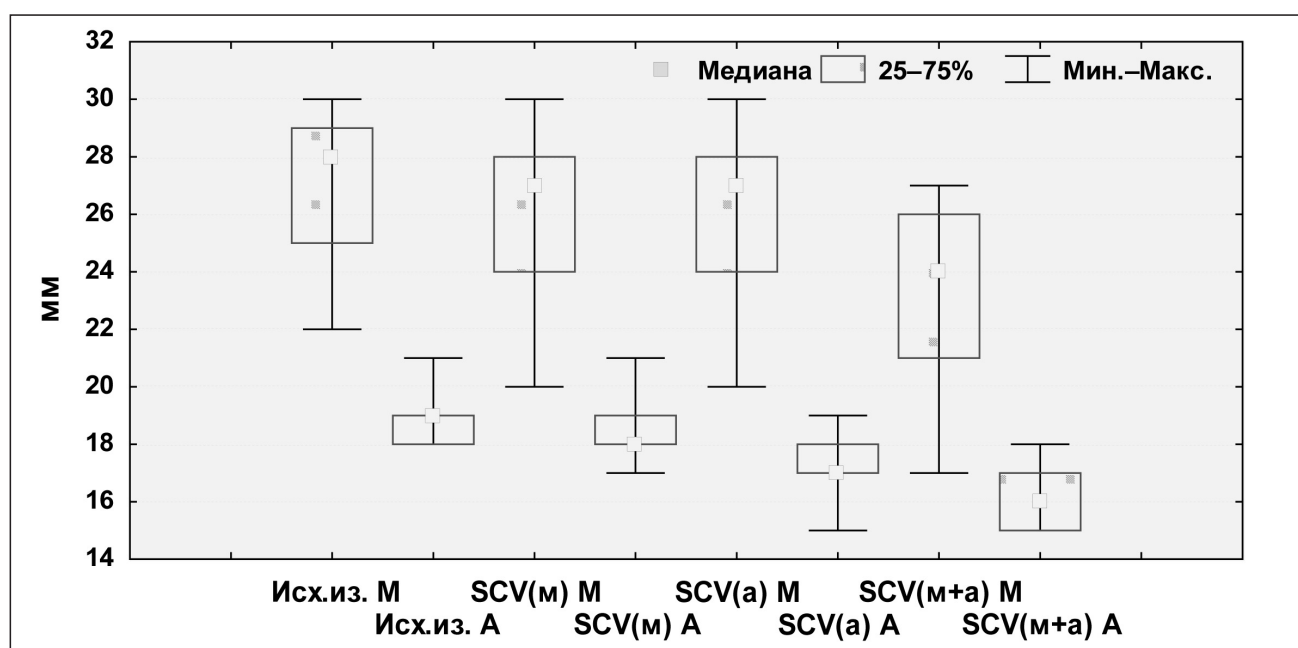


Рис. 3. Зоны ингибирования (мм) антибиотиками меропенемом — М, амикацином — А, исходных изолятов — исх. из. *K.pneumoniae* и SCV-персистеров различного происхождения: индуцированных высокими концентрациями меропенема — SCV(м), амикацина — SCV(а), меропенема и амикацина — SCV(м+а).

(амикацин — 18 мм, меропенем — 25 мм) относились к категории WT (wild-type) — не имеющие механизмов устойчивости [17].

Результаты проведенного нами исследования показали, что антибиотики с отличающимися механизмами действия формировали популяции персистеров с различной интенсивностью, в связи с чем, корреляции между численностью этих популяций не наблюдалось, следовательно, механизмы толерантности к антибиотикам различались. АТ популяции *K.pneumoniae*, характеризовалась фенотипической гетерогенностью и были представлены фенотипами персистеров SCV и NCV.

Меропенем и амикацин в отдельности способствовали увеличению доли SCV в популяциях. Повышенное образование SCV-форм при воздействии одним антибиотиком — амикацином — существенно уменьшалось при его совместном действии с меропенемом, что вносит вклад в синергетический эффект этих двух препаратов, с другой стороны — комбинация меропенема с амикацином индуцировала повышение адаптивной устойчивости SCV-персистеров к этим препаратам, которая в сочетании с более длительным временем задержки роста SCV может иметь преимущество во время инфекции, способствуя вы-

живанию в среде с антибиотиками. Таким образом, присущая бактериальным популяциям гетерогенность способствует их адаптации к колебаниям окружающей среды, а использование синергетических комбинаций антибиотиков может привести к неудаче в терапии инфекций в результате того, что в бактериальной популяции образуются фенотипически устойчивые к ним формы.

Современные лабораторные подходы к определению чувствительности к антибиотикам бактерий не охватывают весь спектр механизмов невосприимчивости к ним. Не всегда с их помощью можно обнаружить гетерорезистентность возбудителей, не говоря уже о том, что адаптационные механизмы, приводящие к формированию фенотипически гетерогенных АТ популяций, полностью исключаются из результата исследования. Важной составляющей их решения является понимание механизмов формирования персистентных форм возбудителей, их популяционных изменений; моделирование и прогнозирование химиотерапевтической эффективности антибиотиков в отношении возбудителей с повышенным образованием персистеров, разработка оптимальных схем антибиотикотерапии, предотвращающих развитие персистентности и резистентности патогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology* 2017; 15: 453–464.
2. Shan Y., Lazinski D., Rowe S., Camilli A., Lewis K. Genetic basis of persister tolerance to aminoglycosides in *Escherichia coli*. *mBio* 2015; 6 Is 2: e00078-15.
3. Chua S. L., Yam J. K., Hao P., Adav S. S., Salido M. M., Liu Y. et al. Selective labelling and eradication of antibiotic-tolerant bacterial populations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature communications* 2016; 7: 10750.
4. Torrey H. L., Keren I., Via L. E., Lee J. S., Lewis K. High persister mutants in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2016; 11 (5): e0155127.
5. Haaber J., Friberg C., McCreary M., Lin R., Cohen S. N., Ingmer H. Reversible antibiotic tolerance induced in *Staphylococcus aureus* by concurrent drug exposure. *mBio* 2015; 6 Is 1: e02268-14.
6. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 230 Is 1: 13–21.
7. Wiuff C., Zappala R. M., Regoes R. R., Garner K. N., Baquero F., Levin B. R. Phenotypic tolerance: Antibiotic enrichment of non-inherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1483–1494.
8. Fleur D. L., Kumamoto C. A., Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (Pt11): 3839–3846.
9. Roberts M. E., Stewart P. S. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* 2005; 151: 75–80.
10. Johns B. E., Purdy K. J., Tucker N. P., Maddocks S. E. Phenotypic and genotypic characteristics of small colony variants and their role in chronic infection. *Microbiol Insights* 2015; 8: 15–23.
11. Leimer N., Rachmühl C., Marques M., Bahlmann A. S. et al. Nonstable *Staphylococcus aureus* small-colony variants are induced by low pH and sensitized to antimicrobial therapy by phagolysosomal alkalization. *J Infect Dis* 2015; 213 (2): 305–308.
12. Proctor R. A., Eijff C., Kahl B. C., Becker K., McNamara P., Herrmann M. et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4 (Pt4): 295–305.
13. Tuchscher L., Medina E., Hussain M., Völker W., Heitmann V., Niemann J. et al. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 2011; 3 (3): 129–141.
14. Kahl B. C., Becker K., Löffler B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29 (2): 401–427.
15. Zhang P., Wright J. A., Osman A. A., Nair S. P. An *aroD* ochre mutation results in a *Staphylococcus aureus* small colony variant that can undergo phenotypic switching via two alternative mechanisms. *Frontiers in Microbiology* 2017; 8: 1001.
16. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty First Informational Supplement, CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2014.
17. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters: Version 8.1. valid from 2018-05-15. (<http://www.eucast.org>).
18. Скала Л. З., Лукин И. Н. Автоматизированное рабочее место микробиолога и химиотерапевта «Микроб-Автомат». Программное обеспечение. Версия 1.13, 2002–2009. Руководство пользователя. М.: МедПроект-3, 2012. — 55 с. / Скала Л. З., Лукин И. Н. Автоматизированное рабочее место микробиолога и химиотерапевта «Микроб-Автомат». Программное обеспечение. Версия 1.13, 2002–2009. Руководство пользователя. М.: МедПроект-3, 2012; 55. [in Russian]
19. Трухачёва Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica: М.: Геотар-Медиа; 2012. / Трухачёва Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica: М.: Геотар-Медиа; 2012. [in Russian]
20. Pu Y., Zhao Z., Li Y., Zou J., Ma Q., Zhao Y. et al. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Molecular cell* 2016; 62 (2): 284–294.
21. Helaine S., Kugelberg E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends in microbiology* 2014; 22 (7): 417–424.
22. Hofsteenge N., Van Nimwegen E., Silander O. K. Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E.coli*. *BMC microbiology* 2013; 13 (1): 25.
23. Goneau L. W., Yeoh N. S., MacDonald K. W., Cadieux P. A., Burton J. P., Razvi H. et al. Selective target inactivation rather than global metabolic dormancy causes antibiotic tolerance in uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; AAC-02552.
24. Vulin C., Leimer N., Huemer M., Ackermann M., Zinkernagel A. S. Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters. *Nature Comm* 2018; 9 (1): 4074.
25. Neou E., Michail G., Tsakris A., Pourmaras S. Virulence of *Acinetobacter baumannii* Exhibiting Phenotypic Heterogeneous Growth against Meropenem in a Murine Thigh Infection Model. *Antibiotics* 2013; 2 (1): 73–82.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

Тутельян Алексей Викторович — д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский инсти-

тут эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; профессор кафедры эпидемиологии ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова МЗ РФ; ННКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва МЗ РФ, Москва

Седых Наталья Григорьевна — м. н. с. лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

Региональные особенности течения пневмоний на современном этапе

Ф. А. КУЧМЕЗОВА, М. Я. ШАБАТУКОВА, Р. М. АРАМИСОВА, *З. А. КАМБАЧОКОВА,
И. Х. БОРУКАЕВА, М. Ж. ЧОЧАЕВА, М. М. ГАБАЕВА, Х. А. САБАНЧИЕВА

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

Regional Features of the Course of Pneumonia at the Present Stage

F. A. KUCHMEZOVA, M. YA. SHABATUKOVA, R. M. ARAMISOVA, *Z. A. KAMBACHOKOVA,
I. KH. BORUKAEVA, M. ZH. CHOCHAEVA, M. M. GABAEVA, H. A. SABANCHIEVA

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

В статье рассмотрены вопросы региональных особенностей диагностики, течения и лечения внебольничных пневмоний (ВП). В структуре больных ВП преобладали лица мужского пола в возрастной группе 70 и более лет, у которых имелось множество сопутствующих заболеваний. В качестве основного возбудителя обнаружена стафилококковая флора. Проводилась в основном эмпирическая антибактериальная терапия, не всегда соответствующая реальной картине микрофлоры пациента.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, региональные особенности, клинико-демографическая характеристика, коморбидный статус.

The article discusses the regional features of the diagnosis, course, and treatment of community-acquired pneumonia (CAP). The cohort of patients with CAP was dominated by males in the age group of 70 years or older, who had many concomitant diseases. Staphylococcal flora was found to be the main pathogen. Empirical antibacterial therapy was mainly carried out, which does not always correspond to the real picture of the microflora of the patient.

Keywords: community-acquired pneumonia, regional features, clinical and demographic characteristics, comorbid status.

Актуальность проблемы

Проблема диагностики пневмоний всё ещё остаётся одной из самых актуальной в клинической практике. В России ежегодно отмечается около 1,5 млн случаев пневмоний, из них 20% пациентов в связи с тяжестью состояния нуждаются в госпитализации. Заболеваемость ВП увеличивается по мере старения, составляя от 20 до 44 случаев на 1000 населения в год среди лиц старше 60 лет. Отмечаются и гендерные различия с преобладанием лиц мужского пола (52–56%) [1–3].

Несмотря на успехи фармакотерапии и разработку новых поколений антибактериальных препаратов (АБП), летальность от пневмонии не снижается и занимает 4-е место в структуре общей смертности (после сердечно-сосудистых, цереброваскулярных заболеваний и злокачественных новообразований). Наименьшая летальность (1–3%) отмечается у лиц молодого и среднего возраста без сопутствующих заболеваний. На-

против, у пациентов старше 60 лет при наличии коморбидных состояний этот показатель достигает 15–30%. Одним из типичных для нашей страны факторов риска летального исхода является позднее обращение пациентов за медицинской помощью [3–6].

Наличие сопутствующих заболеваний (сердечно-сосудистых, неврологических, иммунодефицитных, онкологических, сахарного диабета, заболеваний почек) является независимым фактором риска неблагоприятного течения и прогноза при ВП. Прогноз заболевания также зависит от наличия таких осложнений, как плевриты, эмпиема, миокардиты, перикардиты и эндокардиты, менингиты, инфекционно-токсический шок, сепсис. Наиболее опасными из осложнений являются абсцессы и гангрена лёгких [7, 8].

Актуальность ВП обусловлена и существующими проблемами ранней диагностики. Так, ошибки в диагностике ВП составляют 20%, а диагноз в первые 3 дня болезни устанавливается лишь у трети больных. Возможной тому причиной является изменение классической клинической картины ВП с острым началом, лихорадкой,

продуктивным кашлем, болями в грудной клетке, воспалительными стигмами в крови, синдромом инфильтрации лёгочной ткани при лучевом исследовании [9, 10].

Главным возбудителем ВП независимо от тяжести течения по-прежнему остаётся *Streptococcus pneumoniae*, на долю которого приходится до 30–35% всех случаев заболевания. Частота выявления того или иного возбудителя ВП варьирует в зависимости от региона проживания и соматического статуса больного, а также возможностей лечебного учреждения по лабораторному типированию патогенов [11–13].

Необходимо учитывать, что на современном этапе резко поменялся микробный пейзаж пневмонии. В целом с годами удельный вес пневмококка как основного возбудителя ВП уменьшается. Например, по данным многолетних наблюдений, частота выделения *S.pneumoniae* у пациентов с ВП в 60-х годах прошлого века составляла 62%, в 80-х — 42%, а с середины 90-х годов — 15,1%. Причём, возбудители ВП с каждым годом становятся более вирулентными, мутируя и становясь резистентными к большинству применяемых антибактериальных средств [8, 14, 15].

Нормальная микрофлора, колонизирующая верхние отделы дыхательных путей, может при определённых условиях, попадая в нижние отделы респираторного тракта, вызывать воспалительную реакцию [13].

Для подбора антибактериальной терапии (АБТ) важное значение имеет определение возбудителя у конкретного больного. Однако применяемые на сегодняшний день в клинической практике лабораторные тесты для обнаружения патогена у больных ВП не всегда имеют высокие степени чувствительности и специфичности [13].

Микробиологическая диагностика при ВП включает культуральное исследование мокроты и других респираторных образцов [8, 14].

Культуральное исследование крови при высокой специфичности отличается низкой чувствительностью — частота положительных результатов гемокультуры варьирует от 5 до 30%. Для выявления *S.pneumoniae* используются молекулярные и серологические методы исследования. В настоящее время получили распространение иммунохромато-

графические тесты с определением в моче антигенов к *S.pneumoniae*. Чувствительность теста варьирует от 70 до 90% и специфичность >90%. Ключевыми преимуществами экспресс-тестов являются быстрота получения результата, доступность клинического материала для исследования, возможность выполнения после начала АБТ без существенного снижения информативности [9, 13].

Необходимо отметить тот факт, что, несмотря на расширение возможностей микробиологической диагностики, примерно у половины пациентов с ВП этиологический диагноз остаётся неустановленным. В этой связи, выбор режима стартовой АБТ осуществляется эмпирически с учётом региональных эпидемиологических данных и индивидуальных особенностей пациента [7, 8, 12].

Цель работы — изучение клинико-демографической характеристики, структуры этиологических факторов и коморбидного статуса больных ВП.

Материал и методы

Проведён ретроспективный анализ истории болезни пациентов, госпитализированных в пульмонологическое отделение городской клинической больницы в 2019 г. с диагнозом ВП. Изучались такие параметры, как половозрастной состав, верифицированный этиологический фактор, локализация воспалительного очага, коморбидный статус.

Результаты и обсуждение

В 2019 г. в пульмонологическое отделение было госпитализировано 622 пациента с ВП. Из них, мужчин 63,5%, женщин — 47,5%. Жителей села было 13,3%, что можно объяснить тем, что в городскую больницу госпитализируются жители

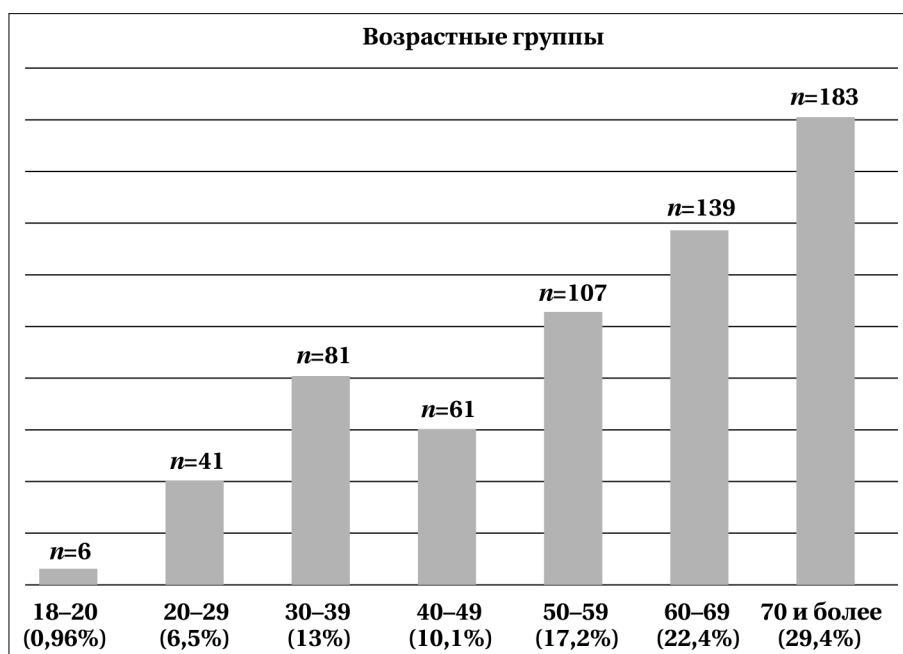


Рис. 1. Возрастная структура больных внебольничной пневмонией.

города, а жители сельских населенных пунктов получают медицинскую помощь в районных больницах и лишь в случаях тяжёлого течения ВП госпитализируются в профильное отделение.

Анализ возрастного состава больных ВП показал преобладание лиц в возрасте 70 лет и старше, которые составили в структуре больных 29,4% (рис. 1). Больных в возрастном периоде от 60 до 69 лет было 22,4%. Наименьший удельный вес имели больные в возрасте 18–20 лет — около 1% и 20–29 лет — 6,5% случаев. Пациенты трудоспособного возраста составили 48%.

Таким образом, в возрастной структуре больных ВП преобладали лица пожилого и старческого возраста.

Анализ локализации воспалительного очага показал, что в 91,1% случаев процесс локализовался в нижних долях. Правосторонняя локализация отмечалась в 66,7%, двустороннее поражение — в 13,8% случаев. Обращает внимание и большой процент верхнедолевых локализаций (10,77%), при которых требуется исключения специфических заболеваний лёгких.

Для микробиологического мониторинга проводилось исследование мокроты на флору и чувствительность к антибиотикам. Бактериальная флора была высеяна в 327 случаях (52,7%), в 47,3% случаев инфекционный патоген не был определен. Вирусологические исследования не проводились в связи с ограниченными техническими возможностями лечебного учреждения.

В структуре выявленных патогенов (рис. 2) преобладали: стафилококковая флора (29,4%), стрептококковая — 20,4%, удельный вес пневмококка составил всего 1,12%. Остальная микрофлора была представлена клебсиелой (2,6%), нейсерией (1,6%), кандидами (0,96%) и энтеробактериями (0,32%).

Необходимо отметить, что в большинстве случаев больные до поступления в стационар самостоятельно принимали АБП, что снижало достоверность полученных результатов, кроме того не у всех пациентов имелась возможность получения мокроты для исследования. Другие методы исследования (определение антител к пневмококкам и др.) в клинической практике отделения не применялись. В это связи в большинстве случаев стартовая АБТ носила эмпирический характер и подбиралась методом «проб и ошибок».

Таким образом, достоверность обнаружения этиологического инфекционного фактора ВП зависит от объёма доступных в клинической практике диагностических методов и тестов, которые потенциально могут быть использованы при обследовании больного.

При курации больных пожилого и старческого возраста, у которых отмечается высокий индекс коморбидности, важное значение имеет учёт

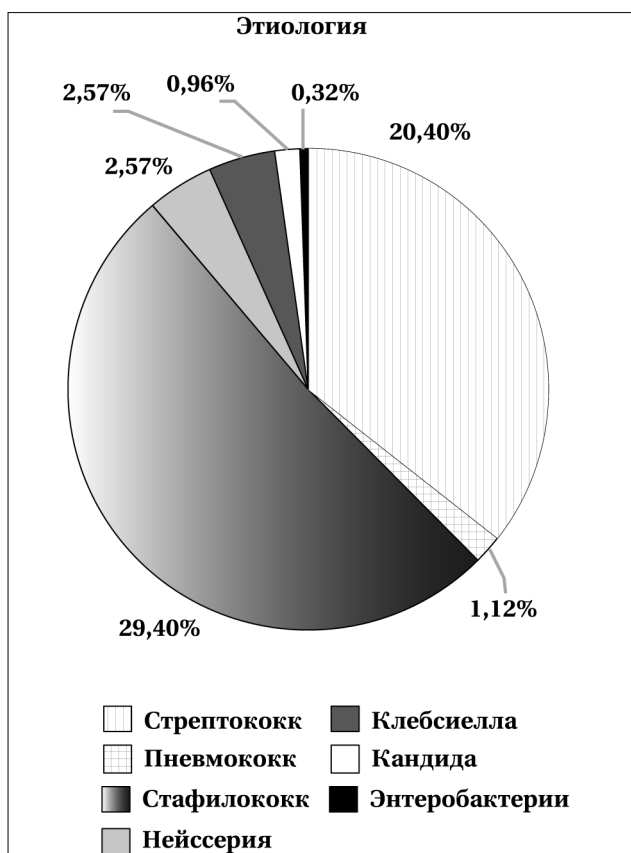


Рис. 2. Этиологическая структура ВП.

его влияния на течение и прогноз ВП. Анализ коморбидности у больных с ВП (рис. 3) показал, что сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания имелись у 88% больных. Из них артериальная гипертензия отмечалась у 50%, ИБС — у 9,9%, хроническая сердечная недостаточность — у 22,1%, постинфарктный кардиосклероз — у 3%, различные аритмии сердца — у 2,6% больных. Достаточно высоким был и показатель сопутствующей хронической обструктивной болезни лёгких — ХОБЛ (29,4% больных).

Заболевания желудочно-кишечного тракта зарегистрированы у 7,2% больных ВП: язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки отмечалась у 2,4% больных, хронический холецистит — у 2,4%, хронический панкреатит — в 1,1% случаев. Заболевания почек в структуре коморбидных состояний составили 5,6%.

Удельный вес эндокринной патологии у больных ВП составил 15,4%, в том числе: СД 2 типа — у 13,6%, патология щитовидной железы — у 1,4% больных.

Наличие сопутствующей патологии с функциональными нарушениями со стороны сердца, почек и печени создаёт сложности в проведении АБТ, что может приводить к ошибкам в выборе АБП, его дозировки, длительности лечения. С учётом возрастного состава заболевших следует учитывать наличие состояний с функциональными нарушениями органов и систем у больных по-

жилого и старческого возраста. Наличие патологии со стороны желудочно-кишечного тракта (в частности, нарушения кишечного всасывания и печеночного клиренса) ограничивает возможности назначения АБП внутрь и проведение ступенчатой терапии. Трудности фармакотерапии у коморбидных пациентов могут возникать в связи с необходимостью приёма различных лекарственных препаратов, у которых не всегда имеется аддитивное взаимодействие с АБП.

Выводы

1. В структуре больных ВП преобладали лица мужского пола в возрастной группе 70 и более лет.
2. Анализ показал превалирование правосторонней ниже-долевой локализации ВП.
3. В качестве основного возбудителя у исследованной популяции обнаружена стафилококковая флора.
4. Проводилась в основном эмпирическая антибактериальная терапия, не всегда соответствующая реальной картине микрофлоры пациента.
5. Учитывая низкую достоверность применяемых методов определения микрофлоры в мокроте, необходимо расширить спектр более достоверных методов диагностических тестов: ПЦР-диагностика, экспресс-диагностика на наличие антигенов респираторных вирусов, серологическая диагностика, определение антигена *S.pneumoniae* в моче и т. д.
6. Фармакотерапию больных ВП необходимо проводить с учётом сопутствующих состояний, среди которых преобладает сердечно-сосудистая патология, оказывающая неблагоприятное влияние на течение и прогноз заболевания, особенно у лиц пожилого возраста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быстрицкая Е.В., Биличенко Т.Н. Анализ заболеваемости пневмониями взрослого и детского населения Российской Федерации за 2010–2014 гг. Пульмонология. — 2017. — Т. 27. — № 2. — С. 173–178. / Bystritskaya E.V., Bilichenko T.N. Analiz zabolevaemosti pnevmioniyami vzroslogo i detskogo naseleniya Rossijskoj Federatsii za 2010–2014 gg. Pul'monologiya 2017; 27: 2: 173–178. [in Russian]
2. Бобылев А.А., Рачина С.А., Авдеев С.Н. и др. Внебольничная пневмония у пациентов пожилого и старческого возраста. Пульмонология. — 2015. — Т. 25. — № 3. — С. 261–276. / Bobylev A.A., Rachina S.A., Avdeev S.N. i dr. Vnebol'nichnaya pnevmoniya u patsientov pozhilogo i starcheskogo vozrasta. Pul'monologiya 2015; 25: 3: 261–276. [in Russian]
3. Фатуллаева Г.А., Богданова Т.М. Пневмония — актуальная проблема медицины. Международный студенческий научный вестник. — 2018. — № 5. URL: <http://eduherald.ru/ru/article/view?id=19158> / Fatullaeva G.A., Bogdanova T.M. Pnevmoniya — aktual'naya problema meditsiny. Mezhdunarodnyj studencheskij nauchnyj vestnik 2018; 5. URL: <http://eduherald.ru/ru/article/view?id=19158> [in Russian]
4. Биличенко Т.Н., Быстрицкая Е.В., Чучалин А.Г., Белевский А.С., Батын С.З. Смертность от болезней органов дыхания в 2014–2015 гг. и пути её снижения. Пульмонология. — 2016. — Т. 26. — № 4. — С. 389–397. / Bilichenko T.N., Bystritskaya E.V., Chuchalin A.G., Belevskij A.S., Batyn S.Z. Smertnost' ot boleznej organov dykhaniya v 2014–2015 gg. i puti ee snizheniya. Pul'monologiya 2016; 26: 4: 389–397. [in Russian]
5. Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Ефимов Е.И. и др. Внебольничные пневмонии: классификация, патогенез, этиология, эпидемиология, лабораторная диагностика на современном этапе. Аналитический обзор. М.: 2013. — 65 с. / Ezhlava E.B., Demina Yu.V., Efimov E.I. i dr. Vnebol'nichnye pnevmonii: klassifikatsiya, patogenez, eti-

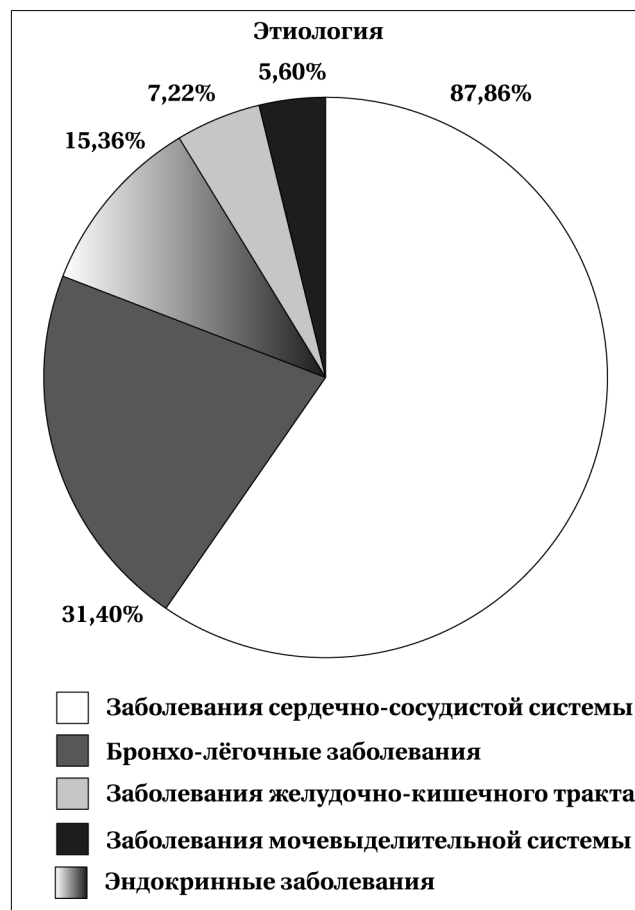


Рис. 3. Структура сопутствующих заболеваний.

7. При подборе АБТ необходимо учитывать взаимодействие с другими лекарственными средствами, применяемыми по поводу сопутствующих заболеваний.

- ologiya, epidemiologiya, laboratornaya diagnostika na sovremennom etape. Analiticheskij obzor. M.: 2013. — 65. [in Russian]
6. Иванова Е.В., Биличенко Т.Н., Чучалин А.Г. Заболеваемость и смертность населения трудоспособного возраста России по причине болезней органов дыхания в 2010–2012 гг. Пульмонология. — 2015. — Т. 25. — № 3. — С. 291–297. / Ivanova E.V., Bilichenko T.N., Chuchalin A.G. Zabolevaemost' i smertnost' naseleniya trudospobnogo vozrasta Rossii po prichine boleznej organov dykhaniya v 2010–2012 gg. Pul'monologiya 2015; 25: 3: 291–297. [in Russian]
7. Круглякова Л.В., Нарышкина С.В. Тяжёлая внебольничная пневмония: диагностика и лечение (обзор литературы). Бюллетень физиологии и патологии дыхания. — 2016. — Вып. 59. — С. 98–108. / Kruglyakova L.V., Naryshkina S.V. Tyazhelaya vnebol'nichnaya pnevmoniya: diagnostika i lechenie (obzor literatury). Bjulleten' fiziologii i patologii dykhaniya 2016; 59: 98–108. [in Russian]
8. Национальные клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2015. / Natsional'nye klinicheskie rekomendatsii «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam», 2015. [in Russian]
9. Чучалин А.Г., Синопольников А.И., Козлов Р.С. и др. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Пособие для врачей. М.: 2010. — 106 с. / Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S. i dr. Vnebol'nichnaya pnevmoniya u vzroslykh: prakticheskie rekomendatsii po diagnostike, lecheniyu i profilaktike. Posobie dlya vrachej. M.: 2010; 106. [in Russian]
10. Чучалин А.Г. Пневмония: актуальная проблема медицины XXI века. Пульмонология. — 2015. — Т. 25. — № 2. — С. 133–142. / Chuchalin A.G. Pnevmoniya: aktual'naya problema meditsiny XXI veka. Pul'monologiya 2015; 25: 2: 133–142. [in Russian]
11. Биличенко Т.Н., Аргунова А.Н., Антонова О.А. и др. Частота пневмококковой пневмонии у взрослых больных терапевтических стаци-

- онаров на трёх территориях Российской Федерации. Пульмонология. — 2013. — № 4. — С. 29–36. / *Bilichenko T.N., Argunova A.N., Antonova O.A. i dr.* Chastota pnevmokokkovoy pnevmonii u vzroslykh bol'nykh terapevticheskikh stacionarov na trekh territoriyakh Rossijskoj Federatsii. Pul'monologiya 2013; 4: 29–36. [in Russian]
12. Клинические рекомендации: внебольничная пневмония (проект). Российское респираторное общество; Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. 2018. — 88 с. / *Klinicheskie rekomendatsii: vnebol'nichnaya pnevmoniya (proekt). Rossijskoe respiratornoe obshchestvo; Mezhhregional'naya assotsiatsiya po klinicheskoy mikrobiologii i antimikrobnoj khimioterapii.* 2018; 88. [in Russian]
 13. *Рачина С.А., Иванчик Н.В., Козлов Р.С.* Особенности микробиологической диагностики при внебольничной пневмонии у взрослых. Практическая пульмонология. — 2016. — № 4. — С. 40–47. / *Rachina S.A., Ivanchik N.V., Kozlov R.S.* Osobennosti mikrobiologicheskoy diagnostiki pri vnebol'nichnoj pnevmonii u vzroslykh. Prakticheskaya pul'monologiya 2016; 4: 40–47. [in Russian]
 14. *Козлов Р.С.* Держим оборону: антимикробные препараты и резистентность микроорганизмов. proAntibiotik. — 2011. — № 1. — С. 11–14. / *Kozlov R.S.* Derzhim oboronu: antimikrobnye preparaty i rezistentnost' mikroorganizmov. proAntibiotik 2011; 1: 11–14. [in Russian]
 15. Программа SKAT (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи. Российские клинические рекомендации. М.: 2017. — 312 с. / *Programma SKAT (Strategiya Kontrolya Antimikrobnoj Terapii) pri okazanii stacionarnoj meditsinskoj pomoshchi. Rossijskie klinicheskie rekomendatsii.* М.: 2017; 312. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кучмезова Фатимат Алимовна — студентка 6 курса Медицинского факультета ФГБОУ Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, Нальчик

Шабатукова Марина Якубовна — студентка 6 курса Медицинского факультета ФГБОУ Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, Нальчик

Арамисова Рина Мухамедовна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой госпитальной терапии ФГБОУ ВО Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, Нальчик

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

Борукаева Ирина Хасанбиевна — профессор кафедры нормальной и патологической физиологии Медицинского факультета ФГБОУ Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, Нальчик

Чочаева Марина Жагофаровна — доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней Медицинского факультета ФГБОУ Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, Нальчик

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

Сабанчиева Хаишат Алиагировна — доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней Медицинского факультета ФГБОУ Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, Нальчик

Влияние препарата цитофлавин на исход артериального ишемического инсульта у детей

*Я. Н. МАДЖИДОВА, А. Э. ХАЛИЛОВА

Ташкентский педиатрический медицинский институт

The Effect of Cytoflavin on the Outcome of Ischemic Stroke in Children

*YA. N. MAJIDOVA, A. E. KHALILOVA

Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent

Цель исследования — оценка влияния включения в схему терапии препарата цитофлавин на динамику показателей артериального ишемического инсульта различной этиологии у детей. Проведено динамическое наблюдение за 47 детьми с артериальным ишемическим инсультом, из них 30 получали цитофлавин: внутривенно капельно медленно 5 мл препарата на 100 мл физиологического раствора, в течение 10 дней. В дальнейшем, через 2, 6 мес. и 1 год после перенесённого заболевания в комплексе реабилитационных мероприятий пациенты получали таблетированную форму препарата 2 раза в день, курс — 25 дней. Контрольную группу составили 17 пациентов, получавших только базисную терапию. Помимо общепринятого, проведены транскраниальная ультразвуковая доплерография и электроэнцефалография, оценка состояния пациентов проводилась с помощью шкал pedNIHSS и PSOM-SNE. Тяжесть судорожных припадков оценивали согласно шкале NHS3. Степень нарушения сознания оценивали по шкале Глазго. Выявлено, что включение цитофлавина в состав нейрометаболической коррекции у пациентов с артериальным ишемическим инсультом положительно влияет на состояние мозговой гемодинамики, что подтверждается данными транскраниальной ультразвуковой доплерографии. Клинический эффект от включения препарата в схему терапии проявляется уменьшением сенсомоторных и когнитивных нарушений, снижением риска формирования очагов эпилептической активности в результате уменьшения зоны пенумбры, что в конечном результате повышает реабилитационный потенциал детей с ишемическим инсультом.

Ключевые слова: ишемический инсульт, мозговая гемодинамика, постинсультная эпилепсия, цитофлавин, реабилитация.

The aim of the study is to assess the impact of cytoflavin inclusion on the dynamics of indicators of arterial ischemic stroke of various etiologies in children. Dynamic monitoring of 47 children with arterial ischemic stroke was carried out, 30 of them received cytoflavin via a slow intravenous drip infusion with 5 ml of the drug per 100 ml of saline for 10 days. Subsequently, after 2, 6 months and one year patients received the tablet form of the drug 2 times a day in the 1st year after the disease in the complex of rehabilitation measures, in the course of 25 days. The control group consisted of 17 patients who received only basic therapy. In addition to the conventional methods of assessment, transcranial ultrasound dopplerography and electroencephalogram were performed; patients were assessed using the pedNIHSS and PSOM-SNE scales. The severity of seizures was evaluated according to the NHS3 scale. The degree of impaired consciousness was evaluated using Glasgow Coma Scale. It was revealed that the inclusion of cytoflavin in neurometabolic correction in patients with arterial ischemic stroke positively affects the state of cerebral hemodynamics, which is confirmed by transcranial ultrasound dopplerography. The clinical effect of the inclusion of the drug in the treatment regimen is manifested by a decrease in sensorimotor and cognitive impairment, a reduced risk of epileptic activity foci forming as a result of a penumbra zone decrease, which ultimately increases the rehabilitation potential of children with ischemic stroke.

Keywords: ischemic stroke, cerebral hemodynamics, post-stroke epilepsy, cytoflavin, rehabilitation.

Введение

По определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), инсульт — это быстро развивающееся фокальное или глобальное нарушение функций мозга, длящееся более 24 ч или приводящее к смерти, при исключении иного генеза заболевания. Выявляемость артериального ишемического инсульта (АИИ) у детей в развитых странах составляет в настоящее время 1,2–2,4 на 100 тыс. детей в год [1–3]. Актуальность про-

блемы ишемического инсульта у детей связана в первую очередь с высоким уровнем инвалидизации и смертности. Установлено, что 10–15% пациентов погибают в течение острого периода ишемического инсульта, около 60–70% пациентов, перенесших церебральный инфаркт, имеют стойкий неврологический дефицит, утрачивают работоспособность и нуждаются в посторонней помощи и повседневном уходе. В возрастном аспекте большинство случаев заболевания (около 40–45% всех случаев) приходится на младший (до 5 лет) возраст, что негативно отражается на дальнейшем психическом и физическом развитии пациентов. При этом средний риск развития по-

© Я. Н. Маджидова, А. Э. Халилова, 2020

*Адрес для корреспонденции: 100140 Узбекистан, Ташкент, ул. Багишамала, 223. Ташкентский педиатрический университет. E-mail: madjidova1@yandex.ru

вторного ишемического инсульта составляет 25%, что определяет актуальность вторичной профилактики данного заболевания [4].

В связи с приведённым выше, всё большее значение приобретает разработка наиболее оптимальных схем терапии заболевания. В настоящее время условно терапию в раннем и позднем восстановительном периоде разделяют на процедуры, направленные на восстановление неврологического дефицита и терапию, направленную на вторичную профилактику инсульта [5–7].

Препарат Цитофлавин (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»), представляет собой комплексную субстратную композицию из двух метаболитов — янтарной кислоты в виде Na,N-метилглуконата сукцината и рибоксина, и двух коферментов — рибофлавина (B2) и никотинамида (PP). Являясь метаболическим корректором, антиоксидантом, цитофлавин стимулирует систему антиоксидантной защиты, а также оказывает выраженное положительное воздействие на энергетические процессы в клетке. В комплексе янтарная кислота, как антиоксидант, инактивирует пероксидазы в митохондриях и повышает активность NAD-зависимых ферментов, а никотинамид и рибофлавин в свою очередь усиливают фармакологическую активность янтарной кислоты. Установлено, что вектор влияния цитофлавина в первую очередь направлен на активацию функционирования поражённых в условиях ишемии и гипоксии церебральных систем [8, 9], и таким образом этот нейротропик воздействует на основные механизмы повреждения головного мозга, в связи с чем важность применения цитофлавина с первых дней возникновения ишемического инсульта не вызывает сомнений и патогенетически оправдано. По результатам клинических исследований таблетированной формы препарата, отмечена его эффективность и безопасность при включении в схемы терапии ряда форм неврологической патологии [10–12].

Цель исследования — оценка влияния включения в схему терапии препарата цитофлавин на динамику показателей артериального ишемического инсульта различной этиологии у детей.

Материал и методы

Проанализированы данные 47 пациентов (29 мальчиков и 18 девочек) в возрасте от 3 до 17 лет (средний возраст $9,14 \pm 5,6$ лет) с признаками острого АИИ, получивших лечение в неврологическом отделении Ташкентского педиатрического медицинского института. Исследование носило характер пилотного, от родителей всех детей было получено информированное согласие.

Диагноз и локализацию патологического очага верифицировали с помощью магнитно-резонансной томографии. В 19 (40,4%) случаях выявлены признаки инфаркта в бассейне правой средней мозговой артерии, в 24 (51,1%) — левой средней мозговой артерии, в 4 (8,5%) — в вертебробазилярном бассейне. Следует отметить, что у детей более часто поражались глубинные веточки средней мозговой артерии — ленти-

кулостриарные артерии, что возможно обусловлено изменениями этих сосудов ещё в перинатальном периоде. Наличие в данной области кальцификатов говорит о перенесённой минерализационной васкулопатии, что подтверждается результатами более ранних исследований [13].

Для количественной оценки выраженности неврологического дефицита в остром периоде использовали педиатрическую модификацию шкалы инсульта Национального института здравоохранения США — pedNIHSS (pediatric National Institutes of Health Stroke Scale) [14, 15].

Динамическую оценку (в момент выписки, через 6 мес., через 1 год и через 2 года) сохраняющейся неврологической симптоматики в восстановительном периоде проводили при помощи Педиатрической шкалы исхода инсульта PSOM-SNE (Pediatric Stroke Outcome Measure). Изучена динамика в пяти сферах: левый и правый сенсомоторный дефицит, воспроизведение речи, понимание речи, наличие когнитивных и речевых нарушений. Суммарная оценка составила от 0 до 10 баллов, 0 баллов — без дефицита, 10 баллов — исход неблагоприятный [16, 17].

Характер судорожных припадков описывался, согласно классификации Эпилепсии и эпилептических синдромов ILAE (2017). Тяжесть судорожных припадков оценивали, согласно шкале NHS3 [18, 19]. Степень нарушения сознания оценивали по шкале Глазго [20].

В зависимости от схемы лечения пациенты были разделены на 2 группы: основную ($n=30$), в которой на фоне базисной терапии (противотёчные и улучшающие реологию крови препараты, противосудорожная терапия) вводился цитофлавин: внутривенно капельно медленно 5 мл препарата на 100 мл физиологического раствора, в течение 10 дней. В дальнейшем, через 2, 6 мес. и 1 год после перенесённого заболевания в комплексе реабилитационных мероприятий пациенты получали таблетированную форму препарата в возрастной дозировке 2 раза в день, курс 25 дней). Контрольную группу составили 17 пациентов, получивших только базисную терапию.

Состояние мозговой гемодинамики в магистральных артериях изучалось при помощи транскраниальной ультразвуковой доплерографии (ТКУЗДГ), оценивались физические параметры кровотока: ЛСК (линейная скорость кровотока), асимметрия кровотока и резистентность сосудов (по индексу Пурсело). С целью выявления эпилептической активности в головном мозге проводилась электроэнцефалограмма.

Статистическую обработку результатов проводили пакетом прикладных программ Statistica 10.0 for Windows с использованием непараметрических методов статистики (критерия χ^2 и Манна–Уитни).

Результаты и обсуждение

Анализ анамнеза заболевания выявил, что почти у половины пациентов (22 ребёнка — 46,8%) преимущественно младшей возрастной группы в качестве провоцирующего агента АИИ послужила острая респираторная вирусная инфекция. Начало заболевания характеризовалось явлениями эндогенной интоксикации и профузного потоотделения, на 2–3-и сутки заболевания у 11 (23,4%) пациентов отмечались судорожные припадки с фокальным моторным дебютом (Джексоновский марш). У 2 (4,2%) пациентов дебюту инсульта предшествовала мигренозная головная боль. Кроме того, было выявлено, что в 18 (38,3%) случаях инсульту предшествовала лёгкая черепно-мозговая травма. В 5 (10,6%) случаях этиология ишемического инсульта осталась неизвестной.

Таблица 1. Частота и спектр неврологических симптомов острого периода АИИ

Симптомы	Число детей,	
	абс.	%
Общемозговые симптомы		
Головная боль	12	25,5
Тошнота, рвота	32	68,1
Головокружение	14	29,8
Адинамия	37	78,7
Повышенная сонливость	19	40,4
Изменение сознания	11	23,4
Очаговая симптоматика		
Гемипарез	43	91,5
Гемианестезия	19	40,4
Бульбарный синдром	3	6,4
Псевдобульбарный синдром	5	10,6
Центральный парез VII и XII пар	38	80,9
Периферический парез VII	1	2,1
Глазодвигательные нарушения	34	72,3
Зрительные нарушения	4	8,5
Нарушение речи по типу афазии	16	34,04
Мозжечковая атаксия	3	6,4
Судорожные припадки	11	23,4

Согласно шкале *pedNIHSS*, у 34 (72,3%) пациентов был диагностирован инсульт средней степени тяжести, умеренно тяжёлый инсульт диагностирован у 10 (21,3%) и тяжёлый инсульт — у 3 (6,4%) больных.

В остром периоде заболевания 12 (25,5%) пациентов жаловались на головные боли, тошноту, онемение лица и языка, у 16 (34%) пациентов отмечалась преходящая моторная афазия. Изменение сознания было зарегистрировано у 6 (12,8%) пациентов. Частота клинических симптомов АИИ в остром периоде представлена в табл. 1.

Таблица 2. Динамика тяжести судорожных припадков в группах исследования

Динамика	Группы	
	I группа	II группа
До лечения	12,31±0,51 (n=7)	12,19±0,3 (n=4)
После лечения	4,2±1,1 (n=2)	8,7±1,7 (n=3)

Клинико-неврологическое исследование выявило у пациентов нарушения двигательных функций в 43 (91,5%) случае в виде гемипареза, в 24 (51,1%) случаях — чувствительные нарушения на контралатеральной стороне от очага поражения, у 3 (6,4%) пациентов — признаки мозжечковой атаксии. У 3 (6,4%) пациентов отмечали бульбарный и у 5 (10,6%) псевдобульбарный синдром, в связи с нарушением глотания кормление детей осуществлялось при помощи назогастрального зонда. Изменение сознания у 6 (12,8%), согласно шкале комы Глазго, составило в среднем $9,3 \pm 1,4$ баллов.

Фокальные эпилептические припадки в дебюте АИИ отмечались в 11 (23,4%) случаях, из них у большинства (9 больных — 81,8%) отмечались моторные, у 2 (18,2%) пациентов — сенсорные фокальные припадки. На фоне проводимой терапии отмечалась положительная динамика, более выраженная в группе пациентов, получивших цитофлавин (табл. 2).

Сохранение судорожных припадков было отмечено у 2 (28,5%) пациентов I группы, но их тяжесть (по шкале *pedNIHSS*) значительно снизилась. Ещё у 2 (28,5%) пациентов отмечалась клиническая ремиссия припадков с сохранением эпилептических паттернов фокального характера

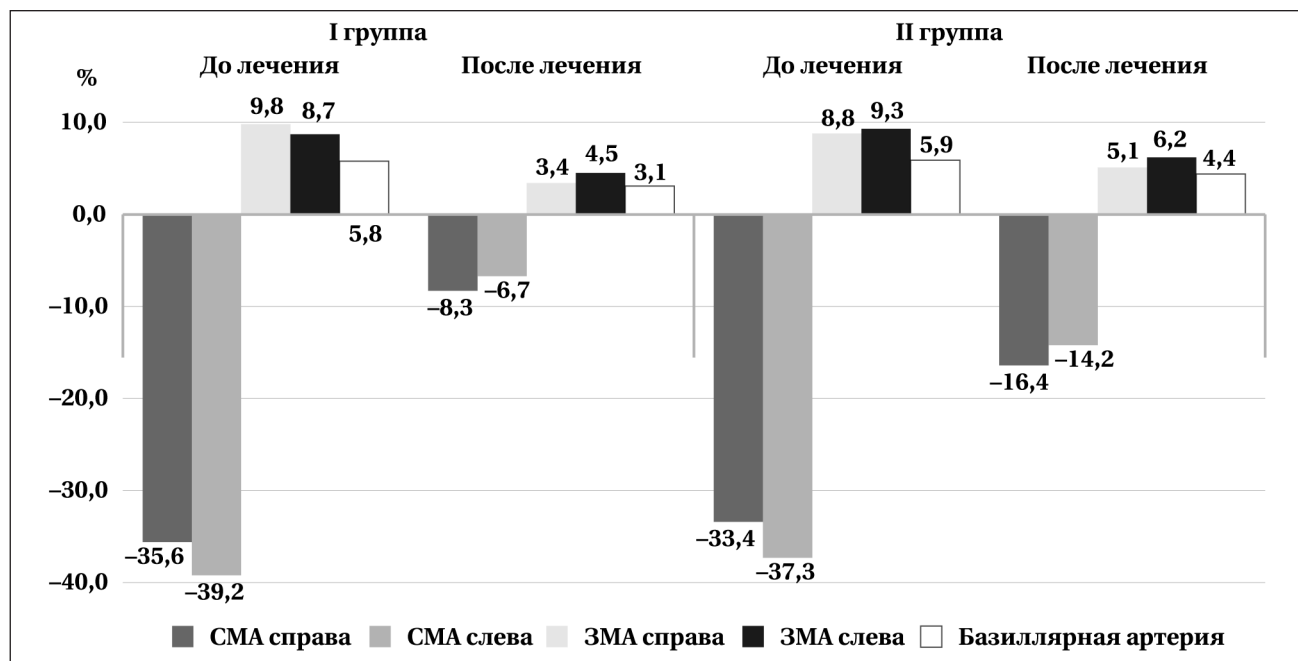


Рис. 1. Показатели мозговой гемодинамики в зависимости от схемы терапии.

Примечание. СМА — средняя мозговая артерия; ЗМА — задняя мозговая артерия. Показатели ЛСК указаны в процентах по отношению к возрастным нормам.

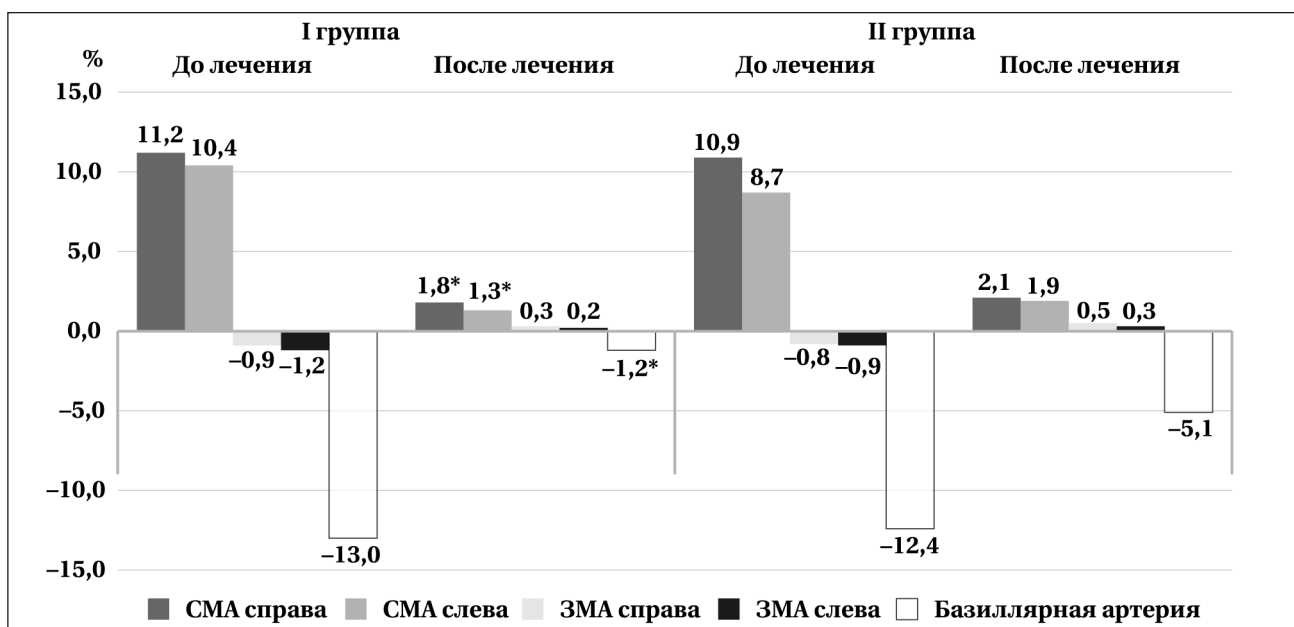


Рис. 2. Показатели мозговой гемодинамики у пациентов с инфарктом в бассейне ВББ в зависимости от схемы терапии.

на ЭЭГ. В группе детей, не получавших цитофлавин, у 3 (75%) в динамике сохранялись судорожные припадки, снижение их тяжести (по шкале pedNIHSS) было менее значительно.

Анализ состояния мозговой гемодинамики выявил снижение линейной скорости кровотока (ЛСК) в сосудах поражённого бассейна, по отношению к нормальным величинам, и повышение индекса резистентности у всех пациентов. Вместе с тем, при сравнении динамики изменений на фоне проводимого лечения отмечен более выраженный положительный эффект у пациентов, получивших в схеме терапии цитофлавин: в 4,2 и 5,8 раз по показателям средней мозговой артерии (СМА) справа и слева и в 2,8 и 1,9 раза по показателям задней мозговой артерии (ЗМА) справа и слева против 2,0 и 2,6 раз и 1,7 и 1,5 раза — в контрольной группе, соответственно ($p < 0,05$) (рис. 1).

В то время, в контралатеральной артерии и других артериях отмечались нормальные показатели ЛСК и даже некоторое их повышение, что можно рассматривать как компенсаторную реакцию на гипоперфузию головного мозга.

Аналогичная картина отмечалась у пациентов с нарушениями в вертебробазилярном бассейне (рис. 2). Так, положительная динамика показателей СМА составила 6,2 и 8 раз у пациентов, получивших в схеме лечения цитофлавин, против 5,2 и 4,6 раз — в контрольной группе ($p < 0,05$), по показателям базилярной артерии — 10,8 против 2,4 раза, соответственно ($p < 0,05$).

Индекс резистентности Пурсело в группах исследования был достоверно повышен в вовлечённых в патологический процесс сосудах (рис. 3). Выявлено, что наиболее выраженная положитель-

ная динамика отмечена у пациентов, получивших цитофлавин, по показателям бассейна СМА.

Тяжесть инсульта оценивалась по шкале PedNIHSS (при поступлении и на момент выписки пациентов из стационара) и имела положительную динамику: у пациентов, получивших в схеме терапии цитофлавин, отмечено снижение с $13,9 \pm 4,3$ баллов до $10,1 \pm 4,1$ баллов при выписке, в контрольной группе — с $13,5 \pm 3,8$ до $10,7 \pm 3,7$ баллов ($p < 0,05$).

Анализ катamnестических данных динамики неврологического статуса, согласно шкале исхода детского инсульта PSOM-SNE, выявил более выраженные положительные изменения у пациентов, получивших в схеме терапии цитофлавин (рис. 4).

Таким образом, включение цитофлавина в схему терапии пациентов с артериальным ишемическим инсультом положительно влияет на состояние мозговой гемодинамики в магистральных артериях и кровотока, особенно в системе средней мозговой артерии (по данным ТКУЗДГ), улучшает показатели резистентности сосудов (по уровню индекса Пурсело), что проявляется более выраженной, по сравнению с контрольной группой, положительной клинической динамикой (по шкалам PedNIHSS и PSOM-SNE). Нежелательных явлений на применение препарата выявлено не было, все пациенты получили терапию в полном объёме.

Выводы

Включение цитофлавина в состав нейрометаболической коррекции у пациентов с артериальным ишемическим инсультом положительно влияет на состояние мозговой гемодинамики, что

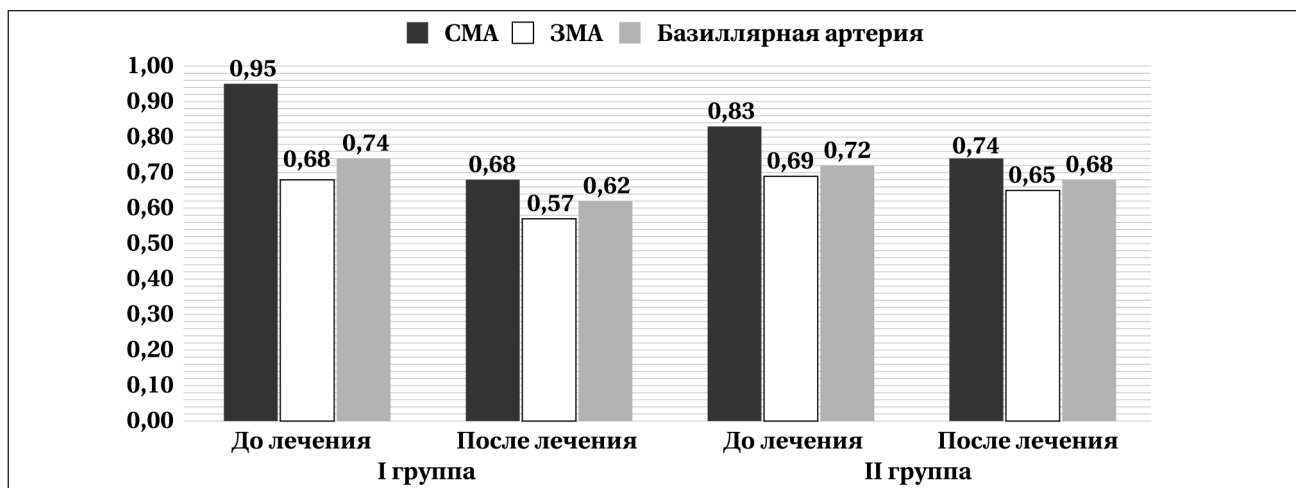


Рис. 3. Состояние резистентности сосудов в повреждённых артериях головного мозга в динамике в зависимости от схемы терапии (индекс Пурсело).

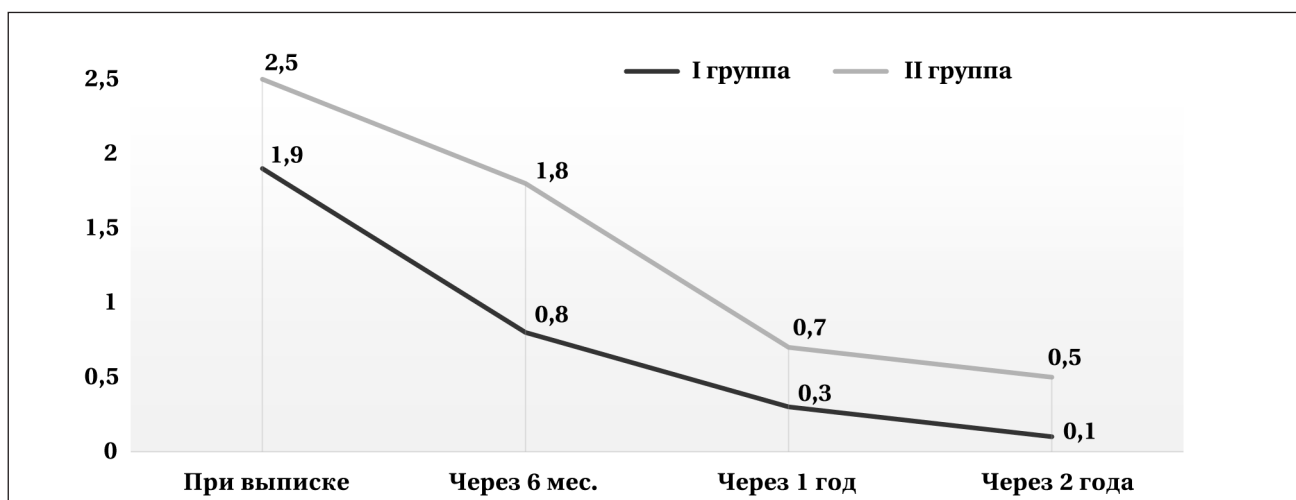


Рис. 4. Динамика показателей неврологического статуса в зависимости от схемы терапии (согласно шкале PSOM-SNE).

подтверждается данными транскраниальной ультразвуковой доплерографии.

Клинический эффект от включения препарата в схему терапии проявляется уменьшением сенсомоторных и когнитивных нарушений, сни-

жением риска формирования очагов эпилептической активности в результате уменьшения зоны пенумбры, что в конечном результате повышает реабилитационный потенциал детей с ишемическим инсультом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beslow L.A., Dowling M.M., Hassanein S.M.A., Lynch J.K., Zafeiriou D., Sun L.R. et al. International Pediatric Stroke Study Investigators. Mortality After Pediatric Arterial Ischemic Stroke. *Pediatrics* 2018 May; 141 (5).
2. Martinez-Biarge M., Ferrero D.M., Cowan F.M. Perinatal arterial ischemic stroke. *Handb Clin Neurol* 2019; 162: 239–266.
3. Kossorotoff M., Chabrier S., Tran Dong K., Nguyen T.S., Dinomais M. Arterial ischemic stroke in non-neonate children: Diagnostic and therapeutic specificities. *Rev Neurol (Paris)* 2019 Jun 7. pii: S0035-3787(18)30968-8.
4. Зыков В.П., Комарова И.Б., Ушакова Л.В. Диагностика и лечение артериального ишемического инсульта у детей в остром периоде. Вопросы современной педиатрии. 2011. — Т. 10. — № 4. — С. 70–77. / Zykov V.P., Komarova I.B., Ushakova L.V. Diagnostika i lechenie arterial'nogo ishemicheskogo insul'ta u detej v ostrom periode. *Voprosy sovremennoj pediatrii* 2011; 10: 4: 70–77. [in Russian]
5. Зыков В.П., Киссель А.Е., Шидеркина И.О. Актуальные проблемы диагностики и лечения детского ишемического инсульта. Трудный пациент. 2018. — Т. 16. — № 8. — С. 37–44. / Zykov V.P., Kissel' A.E., Shiderkina I.O. Aktual'nye problemy diagnostiki i lecheniya detskogo ishemicheskogo insul'ta. *Trudnyj patsient* 2018; 16: 8: 37–44. [in Russian]
6. Ковтун О.П., Львова О.А., Гусев В.В., Чарушикова А.А., Межирицкая М.С. Ишемический инсульт в молодом возрасте и у детей: особенности факторов риска и этиологии. Нейрохирургия и неврология детского возраста. — 2011. — № 4. — С. 32–38. / Kovtun O.P., L'vova O.A., Gusev V.V., Charushnikova A.A., Mezheritskaya M.S. Ishemicheskij insul't v molodom vozraste i u detej: osobennosti faktorov riska i etiologii. *Nejrokhirurgiya i nevrologiya detskogo vozrasta*. 2011; 4: 32–38. [in Russian]
7. Söbő E., Özdemir N., Uysal S., Buyru N., Celkan T. Pediatric Stroke: A Single-Center Experience. *J Pediatr Hematol Oncol* 2019 Jun 27.
8. Федин А.И., Румянцев С.А., Пирадов М.А., Скородец А.А., Густов А.В., Ключева Е.Г. и др. Эффективность нейрометаболического препарата цитофлавина при инфарктах мозга (многоцентровое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование). Вrach. — 2006. — № 13. — С. 52–58. / Fedin A.I., Rumyantseva S.A., Piradov M.A., Skoromets A.A., Gustov A.V., Klocheva E.G. i dr. Effektivnost' nejrometabolicheskogo preparata tsitoflavina pri infarktakh mozga (mnogotsentrovoye platsebo-kontroliruyemoye randomizirovannoye issledovanie). *Vrach* 2006; 13: 52–58. [in Russian]

9. Силина Е.В., Румянцев С.А., Афанасьев В.В., Ступин В.А., Комаров А.Н., Гамбоева Н.А. и др. Антиоксидантная энергокоррекция при острой и хронической цереброваскулярной патологии. Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова. — 2015. — № 113 (10). — С. 88–94. / *Silina E.V., Rumyantseva S.A., Afanas'ev V.V., Stupin V.A., Komarov A.N., Gamboeva N.A. i dr. Antioksidantnaya energokorreksiya pri ostroj i khronicheskoj tserebrovaskulyarnoj patologii. Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S. S. Korsakova. 2015; 113 (10): 88–94. [in Russian]*
10. Белова Л.А., Машин В.В., Колотик-Камеенева О.Ю., Белова Н.В., Бырина А.В., Евстигнеева А.Ю. и др. Эффективность цитофлавина у больных с гипертонической энцефалопатией и конституциональной венозной недостаточностью. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2012. — № 112 (8). — С. 21–26. / *Belova L.A., Mashin V.V., Kolotik-Kameneeva O.Yu., Belova N.V., Byrina A.V., Evstigneeva A.Yu. i dr. Effektivnost' tsitoflavina u bol'nykh s gipertonicheskoj entsefalopatiej i konstitutsional'noj venoznoj nedostatochnost'yu. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova 2012; 112 (8): 21–26. [in Russian]*
11. Суслина З.А., Танахан М.М., Румянцев С.А., Скромец А.А., Ключева Е.Г., Шоломов И.И. и др. Коррекция астеноневротического синдрома по материалам многоцентрового рандомизированного исследования. Поликлиника. — 2007. — № 1. — С. 21–24. / *Suslina Z.A., Tanashan M.M., Rumyantseva S.A., Skromets A.A., Klicheva E.G., Sholomov I.I. i dr. Korrektsiya astenonevroticheskogo sindroma po materialam mnogotsentrovogo randomizirovannogo issledovaniya. Poliklinika 2007; 1: 21–24. [in Russian]*
12. Полунина А.Г., Осинковская Н.А., Гудкова А.Н., Гехт А.Б. Влияние цитофлавина на симптомы астении, эмоциональное состояние и вегетативную регуляцию у пациентов с органическим астеническим расстройством. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2014. — № 2. — С. 28–32. / *Polunina A.G., Osinovskaya N.A., Gudkova A.N., Gekht A.B. Vliyanie tsitoflavina na simptomy astenii, emotsional'noe sostoyanie i vegetativnuju regulatsiyu u patsientov s organicheskim astenicheskim rasstrojstvom. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova 2014; 2: 28–32. [in Russian]*
13. Щедеркина И.О., Витковская И.П., Колтунов И.Е., Лившиц М.И., Чмутин Г.Е., Бузина Н.В. и др. Инсульт у детей. Формирование педиатрического регистра инсультов: международный и региональный опыт. Русский журнал детской неврологии. — 2018. — Т. 13. — № 1. — С. 7–19. / *Shchederkina I.O., Vitkovskaya I.P., Koltunov I.E., Livshits M.I., Chmutin G.E., Buzina N.V. i dr. Insul't u detej. Formirovanie pediatricheskogo registra insul'tov: mezhdunarodnyj i regional'nyj opyt. Russkij zhurnal detskoj nevrologii 2018; 13: 1: 7–19. [in Russian]*
14. Ichord R.N., Bastian R., Abraham L., Askalan R., Benedict S., Bernard T.J. et al. Interrater reliability of the Pediatric National Institutes of Health Stroke Scale (PedNIHSS) in a multicenter study. *Stroke* 2011; 42 (3): 613–617.
15. Adams H.P. Jr., Davis P.H., Leira E.C., Chang K.C., Bendixen B.H., Clarke W.R. et al. Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke: A report of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). *Neurology* 1999; 53 (1): 126–131.
16. Ziesmann M.T., Nash M., Booth F.A., Rafay M.F. Cardioembolic stroke in children: a clinical presentation and outcome study. *Pediatr Neurol* 2014; 51 (4): 494–502.
17. Kitchen L., Westmacott R., Friefeld S., MacGregor D., Curtis R., Allen A. et al. The pediatric stroke outcome measure: a validation and reliability study. *Stroke* 2012; 43 (6): 1602–1608.
18. Scheffer I.E., Berkovic S., Capovilla G., Connolly M.B., French J., Guilhoto L. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017 Apr; 58 (4): 512–521.
19. O'Donoghue M.F., Duncan J.S., Sander J.W. The National Hospital Seizure Severity Scale: a further development of the Chalfont Seizure Severity Scale. *Epilepsia* 1996 Jun; 37 (6): 563–571.
20. Lo W., Gordon A.L., Hajek C., Gomes A., Greenham M., Anderson V. et al. Pediatric stroke outcome measure: predictor of multiple impairments in childhood stroke. *J Child Neurol* 2014 Nov; 29 (11): 1524–1530.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Маджидова Якутхон Набиевна — профессор, д. м. н., Главный невролог Минздрава РУз., заведующая кафедрой неврологии, детской неврологии и медицинской генетики Ташкентского педиатрического медицинского института, Ташкент, Узбекистан. ORCID 0000-0001-7996-7967

Халилова Алие Эмирасовна — к. м. н., доцент кафедры неврологии, детской неврологии и медицинской генетики ТашПМИ, заведующая детским неврологическим отделением клиники ТашПМИ, Ташкент, Узбекистан. ORCID: 0000-0003-2000-2217

Воздействие полисахаридов из морских водорослей на патогенетические мишени *Helicobacter pylori* — новое направление в терапии и профилактике хеликобактерной инфекции

Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, *Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹,
С. П. КРЫЖАНОВСКИЙ², А. К. ГАЖА¹, Е. Ю. ДОБРЯКОВ³, Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА⁴

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

² Дальневосточный Федеральный Университет, Владивосток

³ Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

⁴ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова ДВО РАН, Владивосток

The Influence of Polysaccharides From Sea Algae on The Pathogenetic Targets of *Helicobacter Pylori* — a New Direction in Therapy and Prevention of Infection

N. N. BESEDNOVA¹, *T. A. KUZNETSOVA¹, T. S. ZAPOROZHETS¹,
S. P. KRYZHANOVSKY², A. K. GAZHA¹, E. YU. DOBRYAKOV³, T. N. ZVYAGINTSEVA⁴

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² Far Eastern Federal University, Vladivostok

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

⁴ G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok

Согласно эпидемиологическим данным, инфицированность *Helicobacter pylori* составляет около 60% населения планеты. Применяемое многокомпонентное лечение в 18–20% случаев не позволяет добиться эрадикации *H.pylori*. Кроме того у большинства пролеченных пациентов через 3–5 лет наступает реинфекция *H.pylori*. Альтернативой антибиотикам при лечении этой инфекции являются продукты из морских водорослей, в частности экстракты и полисахариды, обладающие антиадгезивными, антитоксическими, иммуномодулирующими, антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Кроме того, полисахариды водорослей оказывают прямое бактерицидное действие и могут разрушать биопленки, образованные *H.pylori*. Представленные в обзоре литературы современные материалы свидетельствуют о перспективности разработок, связанных с использованием экстрактов и полисахаридов из морских водорослей в качестве основы лекарственных препаратов, БАД к пище и продуктов функционального питания для профилактики и лечения хеликобактерной инфекции.

Ключевые слова: морские водоросли, полисахариды, инфекция *Helicobacter pylori*, патогенетические мишени, гастроэнтерология.

According to epidemiological data, 60% of the world's population suffers from *Helicobacter pylori* infection. The multicomponent treatment used in 18–20% of cases does not allow eradication of *H.pylori*. In addition, reinfection with *H.pylori* occurs in the majority of treated patients in 3–5 years. An alternative to antibiotics in the treatment of this infection are seaweed products, in particular extracts and polysaccharides with anti-adhesive, anti-toxic, immunomodulatory, antioxidant, and anti-inflammatory properties. Furthermore, algae polysaccharides have direct bactericidal effect and can destroy biofilms formed by *H.pylori*. The modern materials presented in the literature review indicate the prospects of developments related to the use of extracts and polysaccharides from seaweed as the basis for drugs, dietary supplements and functional food products for the prevention and treatment of *H.pylori* infection.

Keywords: seaweed, polysaccharides, *Helicobacter pylori* infection, pathogenetic targets, gastroenterology.

Введение

Открытие бактерии *Helicobacter pylori* явилось значительным событием в медицине. История его связана с изучением этиологии и патогенеза хронического гастрита и язвенной болезни.

Гипотеза об инфекционной природе этих болезней возникла ещё в конце XIX — начале XX веков, когда в литературе появились сообщения об обнаружении у человека (в 1906 г.) и собак (в 1874 г.) этих спиралевидных бактерий. Однако только через 100 лет была доказана их этиологическая роль. Австралийские исследователи В. J. Marshall и Л. R. Warren в 1984 г. сообщили об открытии и успешном культивировании новой бактерии, выделенной из биоптатов слизи-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 690087, Владивосток, Сельская, 1. НИИ эпидемиологии и микробиологии. E-mail: takuznets@mail.ru

стой оболочки желудка пациентов с язвенной болезнью и хроническим гастритом [1]. Этим возбудителем поражено в настоящее время около 60% населения планеты [2].

Основным природным резервуаром его является человек. *H. pylori* уникален тем, что возбудитель может сохраняться в течение десятилетий в агрессивной среде желудка, где он повреждает слизистую этого органа и изменяет его физиологию [3]. Колонизация *H. pylori* слизистой оболочки желудка сопровождается воспалением, у части инфицированных лиц (от 1 до 5%) возникают манифестные формы *H. pylori*-ассоциированных заболеваний. К ним относятся хронический гастрит (20%), язвенная болезнь (10–20%) и аденокарцинома дистального отдела желудка или MALT-лимфома (1–2%). Это делает *H. pylori* сильным фактором риска развития злокачественных новообразований и канцерогеном I класса [4]. Реже *H. pylori* бывает одной из причин возникновения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, железодефицитной анемии, крапивницы, рефлюкс-эзофагита, атеросклероза, атопического дерматита, розacea, псориаза, гнездной алопеции, системной склеродермии и пр. [5, 6]. Применяемое многокомпонентное лечение в 18–20% случаев не позволяет добиться эрадикации *H. pylori*. Большинство неудач в эрадикационной терапии связано с формированием устойчивости *H. pylori* к антибиотикам и способностью образовывать биоплёнку [7], а также с высокой бактериальной нагрузкой и нарушением иммунной защиты слизистой желудка. Кроме того, применение существующих и используемых для эрадикации возбудителя препаратов не предотвращает риск повторного заражения. Немаловажную роль играет достаточно высокая стоимость этого лечения. Поэтому эрадикация *H. pylori* представляет собой серьёзную проблему, стоящую перед медицинской наукой [2].

В связи со снижением эффективности существующих методов лечения хеликобактерной инфекции в литературе достаточно часто обсуждается вопрос об эрадикации *H. pylori* и снижении интенсивности вызванного этим возбудителем воспалительного процесса с помощью сульфатированных полисахаридов (СПС) из разных видов морских водорослей. Это связано с тем, что СПС проявляют антиадгезивное действие по отношению к бактериям и вирусам и снижают интенсивность воспалительного процесса, подавляя образование провоспалительных цитокинов и хемокинов [8, 9]. Сегодня при создании антимикробных препаратов наиболее перспективным и привлекательным является, в первую очередь, антиадгезивный эффект изучаемых веществ, в связи с чем использование водорослевых полисахаридов для блокирования адгезии *H. pylori* к клеткам хо-

зяина может предотвратить инфекцию. Полисахариды специфически предотвращают прикрепление бактерий к тканям хозяина или отделяют их от слизистой на ранней стадии инфекции. В этом случае частота мутаций, приводящих к развитию бактериальной резистентности, низка по сравнению с применением антибиотиков [10].

Немаловажным является то обстоятельство, что водорослевые СПС могут воздействовать и на другие патогенетические мишени возбудителя, поскольку эти соединения, кроме антиадгезивной и противовоспалительной, обладают антитоксической, антиоксидантной, иммуномодулирующей, антимикробной и антикоагулянтной активностями [9, 11].

Настоящая работа включает в себя обзор современных представлений о возможности использования СПС морских водорослей в качестве основы лекарственных препаратов, БАД к пище и продуктов функционального питания для профилактики и лечения хеликобактерной инфекции.

Патогенетические мишени для воздействия терапевтических агентов при хеликобактерной инфекции

H. pylori имеет достаточно широкий набор факторов патогенности, позволяющих бактерии выживать в кислой среде желудочного содержимого, вызывать хроническое воспаление и колонизировать слизистую оболочку желудка [12]. Они же являются и мишенями для изучения эффективности разрабатываемых новых лекарственных препаратов. Важнейшими факторами патогенности *H. pylori* являются подвижность [13], образование биоплёнок, адгезивные свойства, уреазы, цитотоксичность. Эти факторы присутствуют практически во всех изолятах возбудителя [14].

Важным фактором патогенности *H. pylori* является способность продуцировать фермент уреазу — маркер колонизации слизистой желудка возбудителя [15], обеспечивающую длительную персистенцию возбудителя в желудке человека и усиливающую воспалительные реакции путём активации моноцитов, нейтрофилов, секреции цитокинов, образования свободных радикалов и окиси азота [16]. Уреаза — цитоплазматический фермент, имеющий аффинитет к муцину желудка — метаболизирует мочевины в аммиак и углекислый газ, нейтрализуя кислоту желудочного сока. Кроме того, она способствует адгезии возбудителя путём взаимодействия с рецепторами CD74 эпителиальных клеток желудка [17].

H. pylori образует каталазу, муциназу, оксидазу, гемолизин, щелочную фосфатазу, белок-ингибитор соляной кислоты, глутамилтрансферазу и целый ряд других ферментов, играющих роль в пато-

генезе хеликобактерной инфекции [13]. Каталаза и супероксиддисмутаза позволяют возбудителю подавлять иммунный ответ организма хозяина.

Адгезины *H.pylori* являются важнейшими факторами патогенности и патогенетическими мишенями возбудителя. Благодаря выработке факторов адгезии бактерии через слой слизи проникают к эпителиальным клеткам желудка, прикрепляются и заселяют их. Адгезины затрудняют фагоцитоз возбудителя полиморфноядерными лейкоцитами [18].

Наиболее изученными адгезинами *H.pylori* являются BabA и SabA — белки наружной мембраны, связывающиеся с системой антигенов Levis на эпителиальных клетках желудка. Эти адгезины распознают специфические углеводные фрагменты желудочного эпителия, что способствует развитию инфекционного и воспалительного процессов в желудочно-кишечном тракте [19].

Высокосульфатированный и богатый сиаловой кислотой муцин желудка обладает способностью блокировать *H.pylori*, предохраняя слизистую желудка от прилипания бактерий [20, 21]. Взаимодействие возбудителя с муцином и клетками происходит посредством углеводно-белковых взаимодействий через лектин-подобные молекулы и распознавание специфической углеводной структуры [4].

К настоящему времени расшифрован геном *H.pylori* и установлено, что штаммы этого возбудителя могут отличаться специфическими участками ДНК. В геноме *H.pylori* в составе так называемых «островков патогенности» присутствуют гены цитотоксичности (CagA, VacA, IceA, BabA) [22]. Цитотоксин-ассоциированный ген A (*CagA*), маркер «островка патогенности» *H.pylori*, участвует в образовании язв, развитии атрофии, разрушении межклеточного матрикса и базальной мембраны, опухоловой инвазии и метастазировании, стимуляции выработки IL-8, способствует усилению антрального гастрита. Наличие гена *CagA* ассоциировано с высоким уровнем воспаления. Обычно *H.pylori* прикрепляется к эпителиальным клеткам слизистой оболочки желудка через белок наружной мембраны и вводит *CagA* в клетки хозяина через секреторную систему IV типа, что приводит к изменениям в передаче сигналов цитокинов и контроле клеточного цикла [21]. При изменении условий внешней среды в неблагоприятную сторону возбудитель проникает в эпителиальные клетки и размножается в двухслойных мембранных везикулах. Как только внешняя среда становится благоприятной, оставшиеся жизнеспособные бактерии выходят во внешнюю среду для повторной колонизации эпителия [21]. Этот процесс позволяет возбудителю избегать действия иммунных факторов макроорганизма.

Важным фактором патогенности *H.pylori* является также VacA — вакуолизирующий токсин,

присутствующий примерно в половине штаммов возбудителя. *In vivo* он вызывает образование эрозий и язв. По-видимому, вакуоли защищают *H.pylori* от бактерицидного действия лизосом, что способствует персистенции бактерий [23]. VacA нарушает транспорт белков, увеличивает проницаемость мембран, повреждает цитоскелет, а также ингибирует опсонизацию бактерий и стимулирует диффузию уреазы через эпителий [15, 22, 24]. VacA оказывает мощное провоспалительное действие в слизистой оболочке желудка, сопровождающееся экспрессией хемокинов, в частности, IL-8 и RANTES, а также проявляет проапоптотическое и некротизирующее действие [25].

Доказано, что *H.pylori* может образовывать биоплёнку на поверхности слизистой желудка, что также способствует колонизации эпителия и выживанию микроорганизма в неблагоприятных условиях [15, 26]. Как правило, плёнку формируют уреазоположительные штаммы возбудителя [27].

Воздействие СПС морских водорослей на патогенетические мишени *H.pylori*

Пусковым фактором инфекционного процесса, вызванного хеликобактером, является адгезия возбудителя к мукоидным клеткам желудочного эпителия. Адгезины *H.pylori* связаны с мембраной, что даёт возможность более тесного контакта возбудителя с клетками хозяина [28]. Кроме того, адгезия позволяет возбудителю избегать механического удаления и создания условий для инвазии, персистенции и репликации.

В основе поиска антиадгезивных препаратов лежит создание эффективных препятствий с разнообразными механизмами действия для установления взаимодействий между лигандами и рецепторами. Изучение молекулярной природы лиганд-рецепторных комплексов, образующихся при взаимодействии микроорганизмов с соответствующими им клетками-мишенями, а также факторов, влияющих на процесс адгезии *in vitro* и *ex vivo*, позволяет разрабатывать профилактические меры, направленные на подавление ранних этапов инфекционного процесса [10]. Применение природных или синтетических аналогов клеточных рецепторов и компонентов тканевых жидкостей способно значительно снизить, а в отдельных случаях и полностью предотвратить прикрепление микроорганизмов к клеткам хозяина.

Антиадгезивные свойства характерны практически для всех полисахаридов как из наземных, так и из морских объектов, в том числе и для СПС морских водорослей. Эти соединения, а также синтетические фрагменты их молекул ингибируют контакт патогенов различных таксономических групп с эукариотическими клетками. Это об-

стоятельство явилось обоснованием использования полисахаридов морских водорослей для исследования возможности профилактики и лечения хеликобактерной инфекции.

Так, применение СПС фукоидана из водоросли *Cladosiphon okamuranus*, растворённого в питьевой воде, за 3 сут до интрагастрального заражения монгольских песчанок *H.pylori* ATCC43504 привело к исчезновению симптомов гастрита — отёка и геморрагий в пилорической части желудка у 6 из 10 животных [29].

При сравнении способности различных СПС (гепарина, гепарансульфата и фукоидана) предотвращать адгезию *H.pylori* к макрофагам мышинной линии клеток J774A.1 наиболее эффективным был фукоидан, подавлявший адгезию на 60–90% по сравнению с гепарином (30–60%) [30].

Различные водоросли могут оказывать разное по интенсивности ингибирующее действие на адгезию возбудителя. Так, Н. Shibata и соавт. [29] установили, что ингибирующее действие в большей степени выражено в случае использования фукоидана из водоросли *C.okamuranus*, чем фукоидана из фукусовых водорослей. При этом предварительная инкубация бактериальной суспензии с фукоиданами усилила ингибирующую способность этих соединений и снизила значение IC_{50} для фукоидана из *C.okamuranus* примерно до 1 мг/мл. В случае обработки полисахаридами клеток желудка ингибирования связывания не было, т. е. ингибирующий эффект фукоидана по отношению к *H.pylori* связан с покрытием этим соединением поверхности бактерий.

Эффективность ингибирования адгезии *H.pylori* полисахаридами зависит при всех прочих условиях и от гидрофобности поверхности возбудителя [30]. Так, например, наиболее гидрофобный микроорганизм рода *Helicobacter* spp. *H.bilis* не ингибировался никакими другими полисахаридами, кроме фукоидана.

В отношении прямого бактерицидного и бактериостатического действия СПС по отношению к *H.pylori* единого мнения пока нет. Одни исследователи наблюдали эти эффекты, другие получили противоположные результаты. По-видимому, причиной этого были различия в методах экстракции, экстрагентах, видах водорослей и пр.

Отсутствие прямого антибактериального действия различных препаратов фукоидана при добавлении их в питательные среды отметили Е. G. Chua и соавт. [31]. В экспериментах авторы использовали сульфатированные 1→3;1→4- α -L-фукуаны — *Fucus A*, *Fucus B* (*Fucus vesiculosus*) и галактофукуаны из *Undaria* (*Undaria pinnatifida*). Фукоиданы не препятствовали росту *H.pylori* в питательной среде. Бактериостатическая или бактерицидная активность не наблюдалась ни для одного из препаратов фукоиданов по отношению к *H.pylori*. Обращает на

себя внимание тот факт, что *Fucus A* и *Fucus B* обладали способностью удалять уже адгезированные к клеткам бактерии [31]. Для выявления этого феномена авторы инокулировали монослой эпителиальных клеток карциномы желудка (AGS) *H.pylori*, отмывали трижды от неприлипших бактерий, лизировали клетки, после чего высевали лизат и подсчитывали число КОЕ в опытных образцах по сравнению с контрольными, чтобы определить, удаляют ли фукоиданы адгезированные бактерии. Результаты экспериментов позволили установить, что все фукоиданы в значительной степени удаляли прилипшие бактерии с поверхности клеток. Это обстоятельство свидетельствовало о том, что полисахариды связываются либо с поверхностью клеток, либо с *H.pylori* более сильной связью, вытесняя микроорганизмы с поверхности клеток. По мнению авторов, этот процесс является специфическим для фукоидана, а не обусловлен неспецифическим коллоидным эффектом. *Fucus A*, в основном, содержал фукозу (59,4%), сульфат (25,3%) и небольшое количество галактозы и полифенолов (3,3 и 3–4%, соответственно). *Fucus B* содержал значительно меньше фукозы (31%) и примерно в 8 раз больше полифенольных антиоксидантных компонентов, чем *Fucus A*. Фукоидан из *Undaria* состоял из фукозы, галактозы и сульфата (42,4, 22,5 и 26,3%, соответственно), а также имел в своём составе небольшое количество полифенолов (2,5%). Все фукоиданы значительно снижали число адгезированных к клеткам бактерий, связь с клетками была обусловлена более высокой аффинностью полисахаридов, что позволяет им вытеснять *H.pylori* с поверхности клетки. Эти результаты были получены авторами впервые [31]. Как мы указывали выше, ранее считалось, что ингибирующее действие полисахарида наблюдается при предварительной обработке бактерий полисахаридом перед инокуляцией [29].

Фракция фукоидана *Fucus B* была наиболее токсичной для клеток карциномы AGS, но нетоксичной для нормальных клеток. Следовательно, если фукоидан, особенно *Fucus B*, способен проникать через защитный слизистый слой желудка и связывать *H.pylori* при низких значениях pH, он может применяться в клинической практике для лечения *H.pylori*-ассоциированного заболевания — рака желудка, а также предотвращать развитие этого тяжёлого осложнения хеликобактерной инфекции [31].

На эффективность фукоидана действует, по-видимому, и pH желудочного сока. Доказательством этого является, например, тот факт, что фукоидан из бурой водоросли *C.okamuranus* ингибировал прикрепление *H.pylori* к мушину желудка свиней при pH 2,0 и 4,0, тогда как два другие полисахарида (фукоидан из фукуса и декстрансульфат), использованные в этих экспериментах, по-

давливали прикрепление только при pH 2,0. Этот факт согласуется с тем, что гетерополисахарид из *C.okamuranus* более эффективен, чем фукан из *F.vesiculosus*. Несульфатированные полисахариды (декстран и маннан) не обладали способностью подавлять адгезию возбудителя к муцину [29].

Так как поверхность бактериальной клетки покрывается фукоиданом, возбудитель теряет способность к адгезии на слизи, и симптомы гастрита при этом затихают. Методом иммуноблота показано, что слой белка на поверхности микроорганизма соединён с фукоиданом. Препараты с антиадгезивной активностью, в частности, фукоиданы, для получения максимального эффекта при хеликобактерной инфекции следует вводить перорально [32].

Некоторые представители других видов рода *Helicobacter* — *H.bilis*, *H.hepaticus* и *H.pullorum* — связывают с хроническим и пролиферативным воспалением кишечника, гепатитом. В эксперименте у мышей они могут вызывать рак печени. N. Lutaу и соавт. [30] исследовали возможность предотвращения адгезии этих микроорганизмов к клеточной линии мышиных макрофагов J774A.1 полисульфатированными полисахаридами (фукоиданом, гепарином и гепарансульфатом). Анализ результатов конкурентного связывания показал, что наиболее эффективным ингибитором этих бактерий был фукоидан, который снижал адгезию трёх энтерогепатотоксических видов *Helicobacter* в большей степени, чем гепарин (60–90% ингибирования против 30–70%, соответственно). Установлена прямая коррелятивная зависимость между гидрофобностью поверхности бактерий и степенью их адгезивности. Из всех протестированных видов *Helicobacter* spp. наиболее эффективное ингибирование гепарином было определено для *H.pullorum*, наиболее гидрофильного микроорганизма. Частично или полностью десульфатированные производные гепарина теряли способность ингибировать адгезию энтерогепатических видов *Helicobacter* spp., что указывает на большое значение сульфатных групп гепарина.

Обсуждая вопрос об антиадгезивных свойствах полисахаридов водорослей, нельзя не остановиться на исследованиях M. F. Loke и соавт. [33], проведённых *in vitro* и *in vivo* с использованием СПС из коммерчески доступных диетических (но не морских, а пресноводных) микроводорослей *Chlorella* и *Spirulina*. В экспериментах был использован коммерческий (Sigma) муцин желудка свиней и *H.pylori*, адаптированный к организму мышей, который служит основным рецептором возбудителя в желудке человека. При 4-недельном до заражения кормлении мышей Balb/c полисахаридом одной из водорослей снижалась бактериальная нагрузка (на 94 и 87%, соответст-

венно), уменьшалась продукция уреазы. Средняя бактериальная нагрузка в желудке снижалась более чем на 50% и в том случае, когда животные получали полисахарид за 2 ч до заражения животных *H.pylori*. Полисахариды предотвращали связывание возбудителя с муцином также и за счёт агглютинации микроорганизмов этими соединениями.

Большую роль в связывании *H.pylori* с муцином и колонизации слизистой играют поверхностные белковые антигены возбудителя AhpC и UreA. Поскольку было доказано, что полисахариды способны связываться с этими белками, авторы считают, что полисахариды конкурируют за сайты связывания муцина, присутствующие на *H.pylori*, что приводит к предотвращению связывания возбудителя с муцином.

Синтезированы протяжённые фрагменты молекул фукоиданов, которые являются потенциальными ингибиторами адгезии микроорганизмов. Первая серия состояла из ди-, тетра-, гекса-, окта-, додека- и гексадекасахаридов, построенных из (1→3) связанных остатков α -L-фукопиранозы, которые соответствовали структуре полисахаридов, выделенных из водоросли *Chorda filum* [34]. Вторая серия компонентов представляла собой ди-, тетра- и гексасахариды, построенные из (1→3) и (1→4)- связанных остатков α -L-фукопиранозы, подобные фрагментам фукоиданов из бурых водорослей *Fucus evanescens*, *Fucus distichus* и др. Эти исследования открывают перспективы разработки новых лекарственных средств на основе синтетических аналогов фрагментов природных полисахаридов для профилактики и терапии инфекционных процессов, в том числе, хеликобактерной инфекции.

В литературе, в основном, представлены результаты исследований эффективности СПС, проведённых в экспериментальных условиях *in vitro* и *in vivo*. Число клинических материалов с участием пациентов с хеликобактерной инфекцией невелико. Так, H. I. Back и соавт. [35] в результате 4-недельного рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования у пациентов с хеликобактерной инфекцией, получавших фукоидан, пришли к выводу, что этот полисахарид можно использовать в составе функциональных продуктов для борьбы с инфекцией.

Группой авторов [36–38] исследована эффективность комбинированного препарата FEMY-R7, состоящего из двух ингредиентов: фукоидана, полученного из морской бурой водоросли *Laminaria japonica*, и спиртового (60% этанол) экстракта семян примулы вечерней. Препарат содержал 7–15% фукозы и 0,1–0,4% пента-О-галлоил- β -D-глюкозы. Фукоидан, как было показано выше, обладает антиадгезивной, противовоспалительной, иммуномодулирующей, антикоагулянтной и

противоопухолевой активностями. Галлотаннины вечерней примулы способны оказывать на *H.pylori* бактериостатическое действие и блокировать адгезию и колонизацию возбудителя в стенке желудка [39].

Исследования были проведены как на экспериментальных животных (мыши), так и с участием пациентов с документированной (по тесту на уреазу и гастроскопии) хеликобактерной инфекцией [36]. Мышей инфицировали внутрижелудочно троекратно с 2-дневным интервалом (5×10^9 КОЕ/мышь). Одновременно перорально дважды в день в течение 7 дней животные получали комбинированный препарат FEMY-R7. Исследование эффективности препарата у пациентов с хеликобактерной инфекцией было плацебо-контролируемым двойным слепым. Пациенты основной группы получали дважды в день по одной капсуле FEMY-R7, содержащей 75 мг экстракта семян вечерней примулы и 75 мг фукоидана, в течение 8 недель. Капсулы с плацебо содержали 150 мг микрокристаллической целлюлозы. В результате использование препарата позволило полностью удалить возбудитель из стенки желудка мышей. Показатель уреазы у пациентов, получавших FEMY-R7, через 4 и 8 нед. снижался в зависимости от дозы на 31,8–42% по сравнению с группой плацебо.

Уровень пепсиногенов I и II — предшественников пепсина — в сыворотке крови является надёжным диагностическим индикатором морфологического и функционального состояния слизистой оболочки желудка при инфицировании организма *H.pylori* [40, 41]. Лечение пациентов новым препаратом FEMY-R7 значительно снизило уровень пепсиногена I в сыворотке крови. Снижался также и уровень пепсиногена II — маркера воспалительного ответа на инфекцию *H.pylori* [41, 42], что обусловило снижение величины показателя отношения пепсиноген I/II. Это свидетельствовало о том, что FEMY-R7 уменьшал интенсивность воспаления за счёт удаления *H.pylori* из слизистой оболочки желудка.

Работая с этим же препаратом, J. Cai и соавт. [38] установили, что лечение пациентов не сопровождалось никакими побочными эффектами со стороны внутренних органов и крови. Эффективность комбинированного препарата была сопоставима с эффективностью пантопразола в дозе 60 мг/кг в день (коммерческий препарат, ингибитор протонной помпы, использован как положительный контроль). При этом FEMY-R7 обладал антибактериальной активностью *in vivo* по отношению к *H.pylori* и предотвращал адгезию и инвазию возбудителя в слизистую оболочку желудка, но в отличие от пантопразола не оказывал значительного влияния на pH желудка, свободную HCl и общую кислотность [38].

Ингибирование адгезии *H.pylori* к муцину желудка является ведущим, но не единственным механизмом действия СПС водорослей на инфекционный процесс, обусловленный этим возбудителем.

Биоплёнки, образуемые *H.pylori*, — ещё одна мишень, на которую могут воздействовать СПС и экстракты водорослей [15, 26]. Терапевтическое воздействие на биоплёнки может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии бактерий к поверхности (этот процесс описан выше), блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией. Также оно может сочетаться с действием бактерицидных агентов (например, с антибиотиками).

Кроме того, фукоидан может оказывать сильное противовоспалительное действие [43], что также играет значительную роль в борьбе с хеликобактерной инфекцией.

Воспаление слизистой оболочки желудка — неизбежный результат взаимодействия *H.pylori* с клетками эпителия желудка. Сульфатированные полисахариды водорослей способны оказывать противовоспалительный эффект на ЖКТ при язвенной болезни, колитах и пр., снижая интенсивность воспалительного ответа путём подавления синтеза ряда медиаторов воспаления, продуцируемых эпителиальными клетками кишечника, избыток которых наблюдается при хеликобактерной инфекции [44]. Противовоспалительное действие отмечено практически для всех водорослей, их экстрактов и большинства полученных из них биологически активных веществ [43, 45]. Плейотропное противовоспалительное действие СПС включает ингибирование селектинов [46], комплемента [47], а также ферментов, участвующих в разрушении тканей при воспалении, таких как гепараназы, эластазы и металлопротеиназы [48]. Противовоспалительные эффекты СПС обусловлены ингибированием ключевых сигнальных путей активации универсального ядерного фактора транскрипции NF- κ B [49, 50].

В составе экстрактов бурых водорослей обнаружены ингибиторы COX-2, iNOS, PGE2, IL-6, TNF α , IL-1 β [51]. Свойством ингибировать высокий уровень COX-2 и NO обладают и СПС из этих гидробионтов [52]. Ингибирующий эффект сопровождается дозозависимым снижением экспрессии генов iNOS и COX-2. На культуре клеток эпителия кишечника мышей CMT-93 показано, например, что фукоиданы из водорослей *S.okamurae* и *Kjelmaria crassifolia* ингибировали повышенную продукцию IL-6 [53]. У мышей Balb/c с экспериментальным колитом, получавших фукоидан, снижался уровень IL-6, TGF β и миелопероксидазы, что не наблюдалось у контрольных животных.

H. pylori активизирует систему комплемента, вызывая комплементзависимое воспаление [54]. В связи с этим фукоиданы, оказывающие ингибирующее действие на альтернативный и классический пути активации комплемента, могут применяться, в том числе, и для снижения интенсивности воспалительного процесса в стенке желудка при хеликобактерной инфекции.

Таким образом, поскольку вклад воспалительного процесса в патогенез хеликобактерной инфекции достаточно велик, СПС, обладающие сильным противовоспалительным действием, могут в дальнейшем найти применение в терапии этой инфекции.

Для развития инфекционного процесса не всегда достаточно способности возбудителя только к адгезии и инвазии в организме хозяина. В подавляющем большинстве случаев микроорганизмы используют такой фактор патогенности, как токсины. *H. pylori* способен воздействовать на организм сильными токсическими субстанциями. В литературе нам не встретились материалы об антиоксидеских свойствах СПС при хеликобактерной инфекции. Однако, по-видимому, данное свойство этих соединений может играть определённую роль в защите от возбудителя, поскольку установлено, что, например, фукоиданы из бурых водорослей разных видов обладают высоким антиоксидеским потенциалом [55].

Известно, что *H. pylori* индуцирует локальный окислительный стресс [56]. Процесс активации перекисного окисления липидов в покровно-эпителиальном пласте приводит к освобождению широкого спектра свободнорадикальных генотоксических и канцерогенных соединений, к числу которых относятся супероксидный анион (O_2^-), окись азота (NO), гидроксильные радикалы, пероксинитрит, ионы нитрозония и нитрит-предшественник канцерогенных N-нитрозосоединений. Свободный радикал окиси азота может оказывать прямое повреждающее действие на структуру ДНК эпителиоцитов [57]. Следовательно, окислительный стресс, провоцируемый хеликобактером уже на ранних этапах хронического гастрита, создает серьёзную опасность генетических мутаций и инициации канцерогенеза.

Экстракты и СПС водорослей являются сильными антиоксидантами [58], способны предупреждать развитие окислительного стресса в живых организмах [59], в связи с чем могут в дальнейшем служить основой для создания лекарственных препаратов с антиоксидантной направленностью.

Выше были показаны негативные эффекты, которые оказывает *H. pylori* на врождённый и адаптивный иммунитет. Подавление иммунной системы этим возбудителем рассматривается в настоящее время в качестве одного из факторов патогенности этого микроорганизма [18]. При хелико-

бактерной инфекции формируется вторичный иммунодефицит. Следовательно, использование иммуномодуляторов, какими являются СПС водорослей, при инфицировании *H. pylori* вполне уместно [45, 60, 61]. При этом имеет место стимуляция не только местной защиты, но и системное воздействие на иммунную систему, поскольку растворимая часть полисахаридов всасывается в кровь [9].

Полисахариды из водорослей (альгинаты, фукоиданы, каррагинаны) изучаются в настоящее время и в качестве средств доставки лекарственных препаратов или пробиотиков для лечения хеликобактерной инфекции [62–65].

Так, разработан способ доставки пробиотического штамма *Lactobacillus fermentum*, инкапсулированного в каррагинан — СПС из красной морской водоросли [63]. Сконструированы устойчивые в желудке альгинатные микрокапсулы [64], а также шарики из альгината [66] с замедленным высвобождением метронидазола, являющиеся перспективными фармацевтическими формами системы доставки лекарств с контролируемым и длительным высвобождением лекарственного средства в место нахождения возбудителя. Другие авторы разработали хитозан-альгинатный полиэлектролитный комплекс для доставки в желудок наночастиц амоксициллина, который показал хорошую мукопепетрацию и локализацию в течение 6 ч [65].

Достаточно давно выпускается и применяется в различных диетах ламиналь — продукт из бурых водорослей, ускоряющий процессы регенерации слизистой оболочки желудка в случаях гастрита, ассоциированного с *H. pylori* [67].

Сульфатированные полисахариды водорослей как перспективные адъюванты вакцин против *H. pylori*

В связи с тем, что до настоящего времени нет альтернативных средств, способных полностью освободить организм от *H. pylori*, достаточно активно проводятся разработки поливалентной вакцины против этого возбудителя [68, 69]. Адъювантами к такой вакцине могут быть СПС водорослей, поскольку в эксперименте и клинике доказана их эффективность [70].

Кроме того, СПС могут служить адъювантами для сопровождения традиционной лекарственной терапии, ослабляя её побочные эффекты, снижая обсеменённость слизистой возбудителем, оказывая противовоспалительное и иммуномодулирующее действие [19].

Заключение

Преодоление резистентности патогенных микроорганизмов к лекарственным препаратам яв-

ляется чрезвычайно важной проблемой для здравоохранения. По оценкам [71, 72], к 2050 г. устойчивые к лекарствам бактерии станут причиной примерно 10 млн смертей ежегодно во всем мире, т. е. больше, чем злокачественные новообразования. В настоящее время из-за этой же причины в 15–20% случаев не удаётся добиться эрадикации *H. pylori*. Следует иметь в виду и тот факт, что у большинства удачно пролеченных пациентов спустя 3–5 лет наступает реинфекция *H. pylori*. Последствия длительного инфицирования организма этим возбудителем влечёт за собой много неблагоприятных последствий.

В борьбе с устойчивым возбудителем продукты из морских водорослей являются, как было изложено выше, хорошей альтернативой ортодоксальным антибиотикам. Представленные материалы свидетельствуют о перспективности разработок, связанных с использованием полисахаридов из морских водорослей при хеликобактерной инфекции, поскольку эти соединения характеризуются мультимодальностью действия и обладают антиадгезивными, антиоксидантными, иммуномодулирующими, антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Полисахариды водорослей оказывают также прямое бактерицидное действие и могут разрушать биоплёнки, образованные *H. pylori*. В литературе в настоящее время представлены преимущественно результаты экспериментальных исследований, касающиеся эффективности полисахари-

дов, полученных из водорослей, при инфекции, вызванной *H. pylori*. Сравнительное исследование СПС различной структуры показало, что все исследованные фукоиданы ингибируют развитие инфекции, вызванной *H. pylori*, но наиболее эффективными являются сульфатированные галактофуканы. Тем не менее до сих пор нет фармацевтических препаратов на основе фукоиданов в связи с трудностью получения образцов со стандартной структурой. За рубежом активно и официально продают и используют экстракты водорослей и полисахариды, выделенные из них, с рекомендациями применять их при хеликобактерной инфекции. Большинство авторов рекомендуют применять полисахариды из водорослей в составе продуктов функционального питания для больных, инфицированных *H. pylori*. Проводятся активные исследования, касающиеся применения морских полисахаридов в качестве средств доставки лекарственных препаратов к месту нахождения возбудителя.

Преимуществами водорослевых полисахаридов являются доступность сырья, меньшая сложность технологических процессов выделения и очистки, выраженная фармакологическая активность и, как правило, низкая токсичность или отсутствие таковой. Сульфатированные полисахариды водорослей можно отнести к поколению препаратов с ассоциированной активностью, перспективных для включения в схемы эрадикационной терапии хеликобактерной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- Marshall B.J., Warren L.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1 (8390): 1311–1315.
- Kao C.Y., Chen J.W., Huang Y.T., Sheu S.M., Sheu B.S., Wu J.J. Genome sequence and annotation of *Helicobacter pylori* strain Hp238, isolated from a Taiwanese patient with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Genome Announc* 2015; 3 (1): e00006–15.
- Wang F., Meng W., Wang B., Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett* 2014; 345 (2): 196–202.
- Menichicchi B., Hensel A., Goycoolea F.M. Polysaccharides as bacterial antiadhesive agents and «smart» constituents for improved drug delivery systems against *Helicobacter pylori* infection. *Curr Pharm Des* 2015; 21 (33): 4888–4906.
- Ярмолик Е.С. Роль хеликобактерной инфекции в развитии хронических кожных заболеваний. Журн Гродненского гос мед университета. — 2012. — № 4. — С. 18–22. / Yarmolik E.S. Rol' khelikobakternoj infektsii v razvitiy khronicheskikh kozhnykh zabolevaniy. Zhurn Grodnenskogo gos med universiteta 2012; 4: 18–22. [in Russian]
- Ахмедов В.А., Гаус О.В. Внежелудочные проявления, ассоциированные с инфекцией *Helicobacter pylori*. *Клин мед.* — 2017. — № 95 (1). — С. 15–22. / Akhmedov V.A., Gaus O.V. Vnezheludochnye proyavleniya, assotsirovannye s infektsiej *Helicobacter pylori*. *Klin med* 2017; 95 (1): 15–22. [in Russian]
- Cammarota G., Sanguinetti M., Gallo A., Posteraro B. Review article: biofilm formation by *Helicobacter pylori* as a target for eradication of resistant infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36 (3): 222–230.
- Shibata H., Imuro M., Uchiya N., Kawamori T., Nagaoka M., Ueyama S. et al. Preventive effects of Cladosiphon fucoidan against *H. pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2003; 8 (1): 59–65.
- Fitton J.H., Stringer D.N., Park A.Y., Karpiniec S.S. Therapies from fucoidan: new developments. *Mar Drugs* 2019; 17 (10): 571.
- Ofec I., Hasty D.L., Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 38 (3): 181–191.
- Menshova R.V., Shevchenko N.M., Imbs T.I., Zvyagintseva T.N., Maluarenko O.S., Zaporoshets T.S. et al. Fucoidans from brown alga *Fucus evanescens*: structure and biological activity. *Front Mar Sci* 2016; 3: 129.
- Delahay R.M., Rugge M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2012; 17: 9–15.
- Поздеев О.К., Поздеева А.О., Валева Ю.В., Гуляев П.Е. Механизмы взаимодействия *H. pylori* с эпителием слизистой оболочки желудка. Факторы патогенности, способствующие успешной колонизации. Инфекция и иммунитет. — 2018. — № 8 (3). — С. 273–283. / Pozdeev O.K., Pozdeeva A.O., Valeeva Yu.V., Gulyaev P.E. Mekhanizmy vzaimodeystviya *H. pylori* s epiteliem slizistoy obolochki zheludka. Faktory patogennosti, sposobstvuyushchie uspekhnoy kolonizatsii. Infektsiya i immunitet 2018; 8 (3): 273–283. [in Russian]
- Clyne M., Dolan B., Reeves E.P. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 268: 135–143.
- Исаева Г. Ш., Валиева Р.И. Биологические свойства и вирулентность *Helicobacter pylori*. *Клин микробиол антимикроб химиотер.* — 2018. Т 20. — № 1. — С. 14–23. / Isaeva G. Sh., Valieva R.I. Biologicheskie svoystva i virulentnost' *Helicobacter pylori*. *Klin Mikrobiol Antimikrob Khimioter* 2018; 20 (1): 14–23. [in Russian]
- Koch K.S., Leffert H.L. Hypothesis: Targeted Ikkβ deletion upregulates MIF signaling responsiveness and MHC class II expression in mouse hepatocytes. *Hepat Med* 2010; 2010 (2): 39–47.
- Mascellino M.T., Margani M., Oliva A. *Helicobacter pylori*: determinant and markers of virulence. *Dis Markers* 2009; 27 (3): 137–156.
- Успенский Ю.П., Горбачева И.А., Суворов А.Н., Галагудза М.М., Барышников А.В., Богданова С.А. Иммунологические изменения при инвазии *Helicobacter pylori*: перспективы создания вакцин. *Трансляционная мед.* — 2018. — Т. 5. — № 6. — С. 31–40. / Uspenskiy Yu.P., Gorbacheva I.A., Suvorov A.N., Galagudza M.M., Baryshnikova N.V., Bogdanova S.A. Immunologicheskie izmeneniya pri invazii *Helicobacter pylori*: perspektivy sozdaniya vaksint. *Translyatsionnaya Med* 2018; 5 (6): 31–40. [in Russian]
- Ayala G., Cruz-Herrera C.F., Romero I. Exploring alternative treatments for *H. pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (6): 1450–1469.
- Kawakubo M., Ito Y., Okimura Y., Kobayashi M., Sakura K., Kasama S. et al. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. *Science* 2004; 305 (5686): 1003–1006.

21. Huang Y., Wang Q.L., Cheng D.D., Xu W.T., Lu N.H. Adhesion and invasion of gastric mucosa epithelial cells by *Helicobacter pylori*. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6: 159.
22. Foegeding N.J., Caston R.R., McClain M.S., Ohi M.D., Cover T.L. An overview of *Helicobacter pylori* VacA toxin biology. *Toxins (Basel)* 2016; 8 (6): e173.
23. Terebiznic M.R., Vazquez C.L., Torbick K., Banks D., Wang T., Hong W. et al. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect. Immun* 2006; 74 (12): 6599–6614.
24. Chauhan N., Tay A.C.Y., Marshall B.J., Jain U. *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exert diverse functionalities in numerous cells: an overview. *Helicobacter* 2019; 24 (1): e12544.
25. Агеева Е.С., Иптышев В.М., Саранчина Ю.В., Штыгашева О.В. Роль апоптоза лимфоцитов крови в дисрегуляции иммунного ответа у пациентов с атрофическим гастритом. *Забайкальский мед вестник*. — 2014. — № 3. — С. 94–98. / Ageeva E.S., Iptyshev V.M., Saranchina Ju.V., Shtygasheva O.V. Rol' apoptoza limfotsitov krovi v dizregulyatsii immunogo otveta u patsientov s atroficheskim gastritom. *Zabajkal'skij med vestnik* 2014; 3: 94–98.
26. Hathroubi S., Servetas S.L., Windham I., Merrell D.S., Ottemann K.M. *Helicobacter pylori* formation at its potential role in pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2018; 82 (2): e00001-18.
27. Cotichia J.M., Sugawa C., Tran V.R., Gurrola J., Kowalski E., Carron M.A. Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease. *J Gastrointest Surg* 2006; 10 (6): 883–889.
28. Oleastro M., Menard A. The role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in adherence and pathogenesis. *Biology (Basel)* 2013; 2 (3): 1110–1134.
29. Shibata H., Kimura-Takagi I., Nagaoka M., Hashimoto S., Sawada H., Ueyama S. et al. Inhibitory effect of *Cladosiphon fucoidan* on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *J Nutr Sci Vitaminol* 1999; 45 (3): 325–336.
30. Luitau N., Nilsson I., Wadstrom T., Ljungh A. Effect of heparin, fucoidan and other polysaccharides on adhesion of enterohepatic *Helicobacter species* to murine macrophages. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 19: 1–18.
31. Chua E.G., Verbrugge P., Perkins T.T., Tay C.Y. Fucoidans disrupt adherence of *H.pylori* to AGS cells *in vitro*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015: 120981.
32. Nagaoka M., Shibata H., Takagi I., Aiyama R., Hashimoto S. Effect of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* (Okinawa Mozuku) on the eradication of *Helicobacter pylori*. *Cell (Tokyo)* 2005; 37: 10: 30–33.
33. Loke M.F., Lui S.Y., Ng B.L., Gong M., Ho B. Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50 (2): 231–238.
34. Krylov V.B., Ustyjuzhanina N.E., Grachev A.A., Nifantiev N.E. Synthesis of large fucoidan fragments, potential inhibitors of microbial adhesion. 4th Baltte Meeting on Microbial Carbohydrates. 2010 Sept 19–22; Hyttiala, Finland. 50.
35. Back H.I., Kim S.Y., Park S.H., Oh M.R., Kim M.G., Jeon J.Y. et al. Effects of fucoidan supplementation on *Helicobacter pylori* in humans. *FASEB J* 2010; 24: 1: Suppl 1b 347.
36. Kim T.S., Choi E.K., Kim J., Shin K., Lee S.P., Choi Y. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activities of FEMY-R7 composed of fucoidan and evening primrose extract in mice and humans. *Lab Anim Res* 2014; 30 (3): 131–135.
37. Kim T.S., Shin K., Jeon J.H., Choi E.K., Choi Y., Lee S.P. et al. Comparative analysis of anti-*Helicobacter pylori* activities of FEMY-R7 composed of *Laminaria japonica* and *Oenothera biennis* extracts in mice and humans. *Lab Anim Res* 2015; 31 (1): 7–12.
38. Cai J., Kim T.S., Jang J.Y., Kim J., Shin K., Lee S.P. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activities of FEMY-R7 composed of fucoidan and evening primrose extract. *Lab Anim Res* 2014; 30 (1): 28–34.
39. Funatogawa K., Hayashi S., Shimomura H., Yoshida T., Hatano T., Ito H. et al. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol* 2004; 48 (4): 251–261.
40. Решетников О.В., Курилович С.А., Кротов С.А., Белковец Ф.В. Физиологическое и клиническое значение пепсиногенов желудка. *Клин мед*. — 2014. — № 3. — С. 26–30. / Reshetnikov O.V., Kurilovich S.A., Krotov S.A., Belkovets F.V. Fiziologicheskoe i klinicheskoe znachenie pepsinogenov zheludka. *Klin med* 2014; 3: 26–30. [in Russian]
41. Massarat S., Haj-Sheykholeslami A., Mohamadkhani A., Zendehdel N., Aliasgari A., Rakhshani N. et al. Pepsinogen II can be a potential surrogate marker of morphological changes in corpus before and after *H.pylori* eradication. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 481607.
42. Choi H.S., Lee S.Y., Kim J.H., Sung I.K., Park H.S., Shim C.S. et al. Combining the serum pepsinogen level and *Helicobacter pylori* antibody test for predicting the histology of gastric neoplasm. *J Dig Dis* 2014; 15 (6): 293–298.
43. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpiniec S.S. Therapies from fucoidan: an update. *Mar Drugs* 2015; 13 (9): 5920–5946.
44. Subhash V., Ho B. Inflammation and proliferation — a causal event of host response to *Helicobacter pylori* infection. *Microbiol* 2015; 161 (6): 1150–1160.
45. Fitton J.H. Therapies from fucoidans: multifunctional marine polymers. *Mar Drugs* 2011; 9: 1731–1760.
46. Soares C.M., Malagoli B.G., Menezes G.B., Pinho V., Souza D.G., Teixeira M.M. et al. Antiadhesive activity of polysaccharide-rich fractions from *Lithothamnion muelleri*. *Z Naturforsch C J Biosci* 2012; 67 (7–8): 391–397.
47. Jin W., Zhang W., Liang H., Zhang Q. The structure — activity relationship between marine algae polysaccharides and anti-complement activity. *Mar Drugs* 2016; 14 (1): 3.
48. Manlusoc J.K.T., Hsieh C.L., Hsieh C.Y., Salac E.S.N., Lee Y.T., Tsai P.W. Pharmacologic application potentials of sulfated polysaccharide from marine algae. *Polymers* 2019; 11: 1163–1184.
49. Park H.Y., Han M.H., Park C., Jin C.Y., Kim G.Y., Choi I.W. et al. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF- κ B, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1745–1752.
50. Wu G.J., Shiu S.M., Hsieh M.C., Tsai G.J. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaeifolium*. *Food Hydrocoll* 2016; 53: 16–23.
51. Sanjeeva K.K.A., Fernando I.P.S., Kim S.Y., Kim W. S., Ahn G., Jee Y. et al. *Ecklonia cava* (Laminariales) and *Sargassum horneri* (Fuciales) synergistically inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammation via blocking NF- κ B and MAPK pathways. *Algae* 2019; 34 (1): 45–56.
52. Saraswaty, Giriwono P.E., Iskandriati D., Tan C.P., Andarwulan N. *Sargassum seaweed* as a source of anti-inflammatory substances and the potential insight of the tropical species: a review. *Mar. Drugs* 2019; 17 (10): 590.
53. Matsumoto S., Nagaoka M., Hara T., Kimura-Takagi I., Mistuyama K., Ueyama S. Fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* Tokida ameliorates murine chronic colitis through down-regulation of interleukin-6 production on colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2004; 136 (3): 432–439.
54. Никитина Л.В. Коррекция иммунных нарушений у детей с хроническим гастродуоденитом, ассоциированным с *Helicobacter pylori*: автореф. дис. канд. мед. наук: Курск, 2012. — 18 с. / Nikitina L.V. Korrektsiya immunnykh narusheniy u detej s khronicheskim gastriduodenitom, assotsirovannym s *Helicobacter pylori*: avtoref. dis. kand. med. nauk: Kursk, 2012; 18. [in Russian]
55. 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 (2): 886–898.
56. Butcher L.D., den Hartog G., Ernst P.B., Crowe S.E. Oxidative stress resulting from *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric carcinogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017; 3 (3): 316–322.
57. Байдик О.Д., Титаренко М.А., Сысолятин П.Г. Роль оксида азота (II) и его активных метаболитов в канцерогенезе полости рта. *Российский стоматол журн*. — 2016. — Т. 20. — № 3. — С. 165–168. / Bajdik O.D., Titarenko M.A., Sysolyatin P.G. Rol' oksida azota (II) i ego aktivnykh metabolitov v kantserogeneze polosti rta. *Rossiiskij stomatol zhurn* 2016; 20 (3): 165–168. [in Russian]
58. Aisaka K., Yokoyama T., Matsuo K. Structural Characteristics and antioxidant activities from five brown seaweed. *J of Applied Glycoscience* 2016; 63 (2): 31–37.
59. Xu S.-Y., Huang X., Cheong K.-L. Recent advances in marine algae polysaccharides: isolation, structure and activities. *Mar Drugs* 2017; 15 (12): 388.
60. Tomori M., Nagamine T., Miyamoto T., Iha M. Evaluation of the immunomodulatory effects of fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* Tokida in mice. *Mar Drugs* 2019; 17 (10): 547.
61. Asker M.S., El Kady E.M., Mahmoud M.G. New trends of the Polysaccharides as a drug. *World J Agri Soil Sci* 2019; 3 (4): 1–22.
62. Lin Y.H., Lu K.Y., Tseng C.L., Wu J.Y., Chen C.H., Mi F.L. Development of genipin-crosslinked fucoidan/chitosan-N-arginine nanogels for preventing *Helicobacter* infection. *Nanomedicine* 2017; 12 (12): 1491–510.
63. Gutiérrez-Zamorano C., González-Ávila M., Díaz-Blas G., Smith C.T., González-Correa C., García-Cancino A. Increased anti-*Helicobacter pylori* effect of the probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain encapsulated in gastric simulations under fasting conditions. *Food Res Int* 2019; 121: 812–816.
64. Pandey S., Kalvadia P., Patel H., Shah R., Gupta A., Shah D. Mucoadhesive microcapsules of amoxicillin trihydrate for effective treatment of *H.pylori*. *Der Pharmacia Sinica* 2014; 5 (2): 45–55.
65. Arora S., Gupta S., Narang R.K., Budhiraja R.D. Amoxicillin loaded chitosan-alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for *H.pylori*. *Sci Pharm*. 2011; 79 (3): 673–694.
66. Adebisi A.O., Conway B.R. Preparation and characterization of gastroretentive alginate beads for targeting *H.pylori*. *J Microencapsul* 2014; 31 (1): 58–67.

67. Аминина Н.М. Биологическая ценность морских водорослей дальневосточного побережья. Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. — 2010. — № 3. — С. 32–35. / *Aminina N.M. Biologicheskaya tsennost' morskikh vodoroslej dal'nevostochnogo poberezh'ya. Rybprom: Tekhnologii i Oborudovanie dlya Pererabotki Vodnykh Bioresursov* 2010; 3: 32–35. [In Russian]
68. *Abadi A.T.B. Vaccine against Helicobacter pylori: inevitable approach. World J Gastroenterol* 2016; 22 (11): 3150–3157.
69. *Pan X., Ke H., Niu X., Li S., Lv J., Pan L. Protection against Helicobacter pylori infection in Balb/c mouse model by oral administration of multi-valent epitope-based vaccine of cholera toxin B subunit-HUUC. Front Immunol* 2018; 9: 1003.
70. *Kuznetsova T.A., Persyanova E.V., Ermakova S.P., Khotimchenko M.Y., Besednova N.N. The Sulfated Polysaccharides of Brown Algae and Products of Their Enzymatic Transformation as Potential Vaccine Adjuvants. Nat Prod Commun* 2018; 13 (8): 1083–1095.
71. *Richter M.F., Hergenrother P.J. The challenge of converting Gram-positive-only compounds into broad-spectrum antibiotics. Ann N Y Acad Sci* 2019; 1435 (1): 18–38.
72. *Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. Nature* 2017; 543 (7643): 15.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

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

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

Крыжановский Сергей Петрович — д. м. н., проректор по медицинским вопросам ДВФУ, Владивосток

Гажда Анна Константиновна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Владивосток

Добряков Евгений Юрьевич — к. м. н., заведующий отделением гастроэнтерологии Медицинского объединения МО ДВО РАН, Владивосток

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

Ингибирующий эффект макролидных полиеновых антибиотиков на репродукцию вирусов

*А. А. БАГИРОВА¹, И. М. ГУСЕЙНОВА², М. Ф. ГАФАР-ЗАДЕ², Х. М. КАСУМОВ¹

¹ Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

² Институт молекулярной биологии и биотехнологий Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

Inhibiting Effect of Macrolide Polyene Antibiotics on Reproduction of Viruses

*A. A. BAGIROVA¹, I. M. GUSEYNOVA², M. F. GAFAR-ZADE², H. M. KASUMOV¹

¹ Institute of Botany of the Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku

² Institute of Molecular Biology and Biotechnologies of the Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku

В обзоре представлен сравнительный анализ ингибирующего действия макроциклических полиеновых антибиотиков на репродуктивные свойства некоторых вирусов различного строения — вирус везикулярного стоматита (ВВС), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), энтеровирус, вирус гриппа и др. Изложены данные о морфологическом строении вирусов и о механизме проникновения вирусов в клетки. Представлены данные относительно транскрипции, сборки вирусов и подавления процесса репликации вирусов в клеточных культурах *in vitro* с помощью некоторых макролидных полиеновых антибиотиков. На основе экспериментальных данных для исследуемых вирусов предложен механизм блокирования полиеновыми антибиотиками процесса проникновения вирусов через цитоплазматические мембраны и их репродукции в клетке.

Ключевые слова: амфотерицин В, леворин, филиппин, вирусы, репродукция, блокирование.

The review provides a comparative analysis of the inhibitory effect of macrocyclic polyene antibiotics on the reproductive properties of some viruses of various structures — vesicular stomatitis virus (VSV), human immunodeficiency virus (HIV), enterovirus, influenza virus, etc. The data on the morphological structure of viruses and on the mechanism of penetration of viruses into cells are presented. The article also provides data on the transcription, assembly of viruses, and inhibition of the process of virus replication in cell cultures *in vitro* using macrolide polyene antibiotics. On the basis of experimental data for the studied viruses, a polyene antibiotics' blocking mechanism of the process of virus penetration through cytoplasmic membranes and their reproduction in the cell is proposed.

Keywords: amphotericin B, levorin, philipine, viruses, reproduction, blocking.

Введение

Известно, что вирусы до контакта с клеткой-хозяином находятся в пассивном состоянии и не могут самостоятельно участвовать в процессе репликации, биосинтеза и сборки последующих вирионов [1, 2]. Вирус активизируется только после контакта с клеткой-хозяином, где на начальной стадии принимают участие рецепторы клетки и белки вирусной оболочки, обеспечивая процесс проникновения вируса в клетку. Репродукция вируса может происходить либо в цитоплазме, либо в ядре. Чтобы предотвратить размножение вируса необходимо блокировать процесс репликации вируса.

Будучи доклеточной биологической субстанцией, вирус не является структурой, способной к самостоятельной репликации собственной нуклеиновой кислоты, биосинтезу белка и последу-

ющей сборке вириона. Поэтому этот процесс имеет место уже после контакта вируса с клеткой-хозяином, то есть с активизацией вируса внутри клетки. Для того, чтобы предотвратить репродукцию вируса и образование вирионов, необходимо воздействовать эффективным соединением в область контакта вируса с клеткой. При действии определённых соединений, обладающих мембранотропным действием, удаётся подавить процесс репродукции вируса.

К мембраноактивным соединениям относятся полиеновые антибиотики (ПА) [3, 4], макроциклические соединения природного происхождения, продуцируемые микроорганизмами *Streptomyces* spp., которые оказывают противогрибковое действие [5, 6]. В основе механизма действия ПА лежит формирование в клеточных и липидных мембранах в комплексе с холестерином структурных ионных каналов молекулярных размеров [3, 4, 7, 8]. Наиболее эффективными из этих антибиотиков являются амфотерицин В, нистатин, филиппин, леворин и их производные. Показано, что нативные и химически модифи-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: e-mail: arifabaghirova@gmail.com

цированные ПА препятствуют росту злокачественных образований [9]. Некоторые из ПА обладают противовирусным эффектом и могут блокировать процесс репродукции вируса [10–13]. В данной статье представлены данные о механизме репродукции вируса в клетке и результаты ингибирующего эффекта репродукции вируса с помощью макролидных полиеновых соединений.

Механизм репродукции вируса в клетке

Репродукция вируса представляет собой уникальную форму размножения чужеродного вируса в клетках человека, животных, растений и бактерий. Вирусная репродукция связана с генетическим механизмом передачи чужеродной вирусной информации клеткам. Здесь реализуется матрично-генетический механизм размножения вирусов с участием нуклеиновых кислот [1, 2]. Вирусы имеют разнообразное морфологическое строение. В зависимости от содержания в геноме вируса РНК или ДНК они разделяются на безоболочечные, оболочечные, одонитевые и двунитевые [2].

Существуют различные пути взаимодействия вируса с клеткой: 1) продуктивная инфекция — вирус размножается и клетка погибает; 2) персистентная (абортивная) инфекция — репродукция вируса не происходит и клетка не утрачивает свои функции; 3) латентная (виrogenная) инфекция — имеет место репродукция вируса, но клетка восстанавливает свои функции.

Вирусы гриппа и полиомиелита проникают в клетку путём пиноцитоза и сливаются с мембраной клетки-хозяина. Растительные вирусы проникают в клетку через повреждённые участки мембран и переходят от одной клетки к другой по цитоплазматическим мостикам [2]. Чувствительность организмов к определённому типу вирусов зависит от наличия на поверхности мембраны рецепторных участков.

Для воспроизведения новых вирионов вирусом используется белоксинтезирующая система внутри клетки-хозяина (стадии транскрипции и трансляции). Сначала вирус вступает в реакцию с поверхностью мембраны, на которой имеются особые белковые рецепторы. В случае РНК-содержащих вирусов (вирус гриппа, энтеровирусы, ВВС, вирус табачной мозаики и др.) заражение клетки начинается с адсорбции вируса на клеточной мембране, где вирус взаимодействует с мембранными белковыми рецепторами клетки. Необходимо учесть, что различные вирусы для связи с клеточной мембраной используют разные клеточные рецепторы. Адсорбированные вирусы с помощью эндоцитоза или путём слияния с клеточной мембраной проникают в цитоплазму, где, освободившись от большинства белков, они начинают реплицироваться. На рис. 1 показан процесс проникновения вируса гриппа в

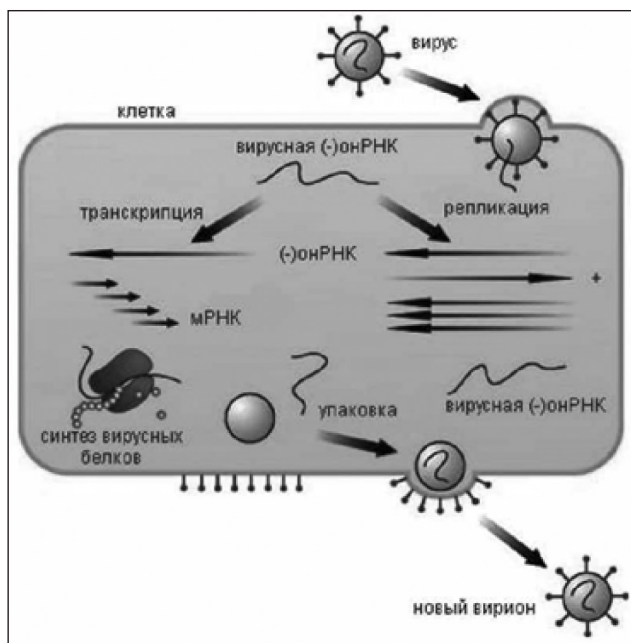


Рис. 1. Проникновение вируса гриппа в клетку (mozok.click).

клетку. Как видно из рис. 1, структура проникающего вируса неоднозначна. Простые вирусы состоят из нуклеиновой кислоты и белковой оболочки, называемой капсидом. В совокупности, простой вирус — это нуклеокапсид, где нуклеиновая кислота и капсид взаимодействуют друг с другом.

Сложные вирусы снаружи окружены липопротеидной оболочкой-суперкапсидом. На оболочке находятся гликопротеиновые шипы. Суперкапсид является производной структурой от мембран вирус-инфицированной клетки. Пусковым фактором проникновения вируса в клетку в большинстве случаев служит связывание вируса с некоторыми поверхностными белками мембранных рецепторов клетки, которые представляют собой белки с соответствующей аминокислотной последовательностью. Вирусные рецепторы находятся в структуре, так называемых «прикрепительных белков», функцией которых является узнавание специфических клеточных рецепторов и взаимодействие вируса с ними. Вирусные рецепторы взаимодействуют с клеточными белковыми рецепторами и в месте контакта происходит агрегация рецепторов, которая запускает механизм внутриклеточной передачи сигнала. Рецепторы клеток участвуют в транспорте через мембраны определённых ионов и макромолекул [2].

Идентификация вирусспецифических рецепторов позволяет использовать их в качестве ингибиторов попадания вирусов в клетку. Однако этот механизм недостаточно эффективен для ингибирования репродукции вирусов, поскольку, с одной стороны, не для всех вирусов найдены клеточные рецепторы, а с другой стороны, вирусы могут использовать несколько рецепторов [2].

Для возникновения инфекционного процесса необходимо наличие соответствующих рецепторов на поверхности клетки. Прикрепление вирусной частицы к клеточной поверхности сначала происходит путём образования единичной непрочной связи с рецептором клетки. Связь настолько слаба, что вирион может отделиться от клетки и перейти на другую клетку. В этом случае имеет место прямая пропорциональная зависимость между концентрацией клеток, взаимодействующих с вирионом, и скоростью адсорбции вирионов. Скорость адсорбции зависит от типа вируса и вида клеток. Взаимодействие вирионов с клеточными рецепторами сопровождается электростатическим прикреплением вириона к поверхности клетки и передачи определённых сигналов в цитоплазму клетки, индуцирующих внедрение вириона в клетку путём эндоцитоза. Взаимодействие вириона с рецепторами приводит к появлению в клетке определённых сигналов трансдукции, которые подготавливают клетку к инвазии вирионов. При этом активируются протеинкиназы, меняется структура поверхности клетки, увеличивается подвижность белково-липидного слоя и усиливается проницаемость мембран. Трансдукция сигналов со стороны вирусов обладает преимуществом по отношению к собственной клеточной системе трансдукции сигналов [13]. Адсорбция вируса подготавливает клетку к последующим стадиям процесса репродукции вируса [2].

Адсорбция многих вирусов начинается с образованием окаймленной ямки на мембране клетки, которая формируется в эндосом-эндоцитозную везикулу. Вирусы в составе эндосом поступают в цитоплазму. Этот процесс характерен для вирусов гриппа, энтеровирусов и возбудителей ОРВИ-аденовирусов [1,2]. Последующее слияние вирусов с мембраной эндосом связано с понижением pH в эндосоме. Здесь важную роль играют белки на внешней оболочке вируса — гемагглютинины. Конформационные изменения гемагглютининов, возникающие при низком pH в эндосоме, приводят к выходу на поверхность мембран амфифильных молекул, что приводит к слиянию внешней оболочки вируса и эндосомальной мембраны. В результате слияния липиды и белки внешней оболочки вируса смешиваются с липидами и белками клеточной мембраны, а нуклеокапсид вируса оказывается в цитоплазме (имеются в виду более простые РНК-содержащие вирусы).

У сложных вирусов в адсорбции и слиянии с клеточной мембраной могут участвовать разные белки внешней вирусной оболочки. Механизмы адсорбции вирусов, их проникновение в клетки, а затем экспрессия и репликация вирусного генома, неодинаковы. После проникновения вируса в

клетку, вирусный геном и связанные с ним белки вируса оказываются в цитоплазме. Внутри заражённой клетки происходит репликация вирусного генома и сборка вирусных белков, из которых собираются новые вирусы (вирионы). Репликация вирусного генома и сборка нуклеокапсидов большинства РНК-содержащих вирусов происходит в цитоплазме (за исключением вируса гриппа, у которого формирование вирусной РНК происходит в ядре, а сборка вирионов в цитоплазме), а у большинства ДНК-содержащих вирусов — в ядре. Выход из клетки зрелых вирусов означает завершение фазы сборки вирусной инфекции, когда зрелые вирусы в заражённых клетках не обнаруживаются. На последнем этапе репродукции вирусы должны покинуть заражённую клетку и не связываться вновь с её поверхностью. Выход из клетки вирусов, не имеющих внешней оболочки, возможен только при условии гибели клетки и распада её мембраны.

Каждый вирус способен репродуцироваться только в клетках определённого типа. Репродукция большинства вирусов сопровождается подавлением синтеза клеточных ДНК, РНК и белков. Вероятно, это связано с тем, чтобы предотвратить или ограничить выработку интерферона и обеспечить собственную репродукцию вирусов прежде, чем в организме сработает полная иммунная реакция. Однако это может привести к остановке клеточного цикла и к апоптозу клетки, заражённой вирусом, поскольку подавление синтеза макромолекул наблюдается путём индукции апоптоза. Этот процесс может иметь важное значение для выхода вирусов из клетки (особенно в случае вирусов, не имеющих внешней оболочки). Капсиды и внешние оболочки надёжно защищают вирусные геномы, позволяя вирусам распространяться из клетки в клетку и передаваться от одного хозяина к другому. Репродукция вирусных геномов подавляется интерфероном, который воздействует на процесс транскрипции вируса [2].

Для вирусов СПИДа и гепатита существует процесс обратной транскрипции. В этом случае вирусы в качестве ферментов содержат обратную транскриптазу и интегразу. У этих вирусов на матрице вирусной РНК с помощью обратной транскриптазы формируется двухцепочечный ДНК-провирус, который встраивается в хромосому клетки-хозяина. Морфология ВИЧ достаточно проста: на поверхности находятся гликопротеиновые шипы, которые позволяют вирусу проникнуть в клетку крови.

Отмечен факт роста вируса гриппа А и В в специфической культуре эпителиальных клеток Vero (почечные клетки африканской зелёной обезьяны) и эпителии носа человека. Клетки Vero широко применяются при изготовлении вирусных вакцин против полиомиелита и бе-

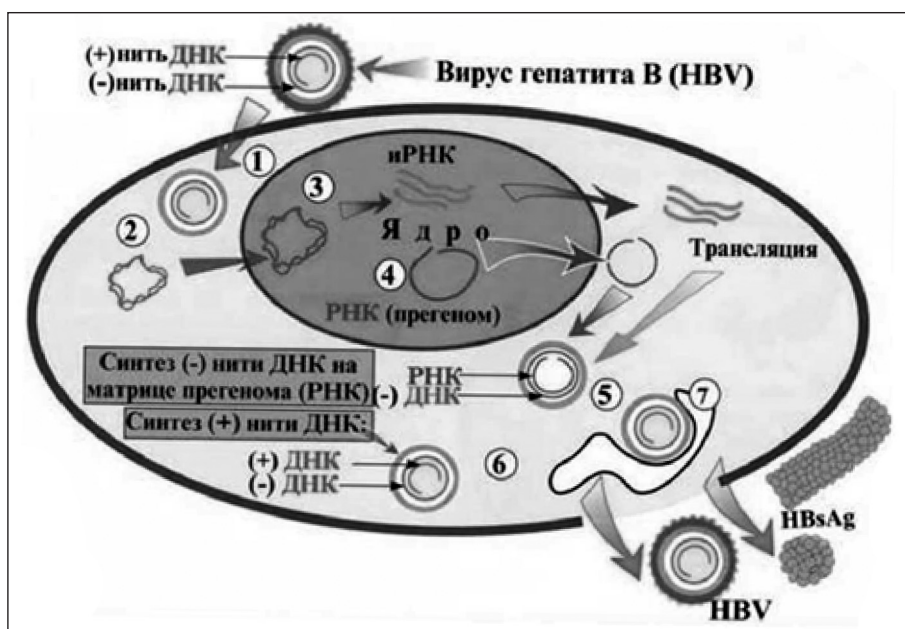


Рис. 2. Репродукция вируса гепатита в клетке (medicine-live.ru).

шенства. Эти клеточные линии оказали положительное влияние на сохранение биологических свойств вируса гриппа. По сравнению со штаммами, полученными из куриных эмбрионов, штаммы вируса гриппа, полученные в клеточной культуре Vero, оказались похожи на человеческие вирусы с точки зрения специфичности их рецептора и процесса гликозилирования. Клеточные культуры Vero используются для вакцинации против оспы, ротавирусной инфекции и гриппа. Увеличение репродуктивной способности вируса гриппа связано с повышением размножения вируса в клетках Vero путём их культивирования без содержания сыворотки [14–16]. Эндосомы не содержат активные вирусы и поэтому они не имеют возможности перейти к этапу вирусной репликации. Для ДНК-содержащих вирусов механизм репродукции демонстрируется на примере вируса гепатита (рис. 2). Геном вируса гепатита В представлен двумя нитями ДНК: (+) нить ДНК и (-) нить ДНК.

Вирус состоит из двух оболочек — суперкапсида и нуклеокапсида, который проникает в цитоплазму, лишившись суперкапсида и белковых молекул на капсиде. Вирус в клетке начинает действовать в форме нуклеокапсида, содержащего две нити ДНК. На рис. 2 показана репродукция вируса гепатита в клетке.

Механизм подавления репродукции вируса полиеновыми антибиотиками

Было показано, что некоторые ПА оказывают действие на вирус СПИДа, энтеровирусы, вирус гепатита, герпеса, гриппа, вирус везикулярного стоматита (ВВС) и растительные вирусы [11–14, 17–19].

Согласно данным литературы, ПА являются единственными в природе мембраноактивными соединениями, индуцирующими в мембранах проницаемость для ионов и органических соединений [3]. Исходя из этого, было сделано предположение, что поскольку ПА взаимодействуют с цитоплазматическими мембранами, они могут блокировать процесс вхождения вируса в клетку и размножения вирионов. Экспериментально показано действие амфотерицина В на процесс ингибирования размножения вирионов в клетке [13, 14]. Эта опция представлена в модели ингибирования вируса гепатита и энтеровируса.

Энтеровирус относительно простой РНК-содержащий вирус, который проникает в клетку путём пиноцитоза. При этом, РНК вируса проходит через цитоплазматическую мембрану клетки-хозяина, а репродукция и сборка вирионов происходит в цитоплазме. Образующиеся вирионы выходят из клетки через отверстие, формирующееся в цитоплазме под действием амфотерицина В. Таким образом, антибиотик может воздействовать только в месте контакта клетки с вирусом до начала пиноцитоза, чтобы не дать вирусу возможность проникнуть внутрь клетки и распространить инфекцию. Исходя из молекулярной модели формирования полиеновых каналов в мембране, ПА могут блокировать проникновение вируса внутрь клетки. Амфотерицин В образует проводящую единицу в виде ионного канала, через который проникают различные низкомолекулярные соединения из околосмембранной жидкости [8]. Формирование подобных каналов может препятствовать проникновению энтеровируса в клетку.

Известно, что энтеровирусная инфекция 71 (EV71) приводит к сердечно-лёгочным осложнениям и смерти у маленьких детей, а в некоторых случаях (в случае полиомиелита) к болезням центральной нервной системы [13]. В этом случае амфотерицин В способен ингибировать репликацию энтеровируса. Амфотерицин В уменьшает экспрессию РНК EV71 и вирусных белков в RD-клетках (клетки рабдомиосаркомы) и клетках НЕК293 (клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека) [13]. Продуцирование вируса EV71 ингибировалось амфотерицином В. Исследования показали, что амфотерицин В дей-

ствуется на ранней стадии включения вируса EV71, препятствуя связыванию и внедрению вируса EV71 в клетки хозяина [13]. Будучи эффективным мембраноактивным соединением, амфотерицин В может быть предложен в качестве нового терапевтического средства для лечения вирусной инфекции EV71 [13]. Необходимо отметить, что амфотерицин В и его метиловый эфир также проявляют противовирусную активность в отношении вируса везикулярного стоматита (ВВС) [19], вирусов простого герпеса 1 (HSV-1) [15], вируса Синдбиса, вируса осповакцины и вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) [11–12, 20–21]. Эти антибиотики использовались и в комбинированной терапии для лечения грибковой и вирусной инфекции [13].

Исследования показали, что метиловый эфир амфотерицина В оказался менее токсичным по сравнению с нативным антибиотиком. На основании экспериментальных данных относительно действия вируса ВВС, можно предложить несколько иной механизм ингибирования репродукции вируса. Следует отметить, что ВВС представляет собой нефрагментированный РНК-содержащий вирус, размножение которого происходит в цитоплазме клетки-хозяина. Однонитевая цепочка РНК находится в оболочке-нуклеокапсиде, который входит в состав другой капсулы-суперкапсида, окружённого гликопротеиновыми шипами. Учитывая тот факт, что ПА чувствительны к мембранам, в составе которых содержатся стеринны, предполагается, что стеринный компонент мембраны клетки-хозяина интегрируется в оболочку вируса, и этот участок становится местом взаимодействия с метиловым производным амфотерицина В [19]. При действии метилового эфира амфотерицина В на вирус ВИЧ, антибиотик связывается с холестерином и разрушает вирусные частицы (вируса ВИЧ) типа ВИЧ-1 [12]. Мембраносвязанный холестерин в комплексе с антибиотиком ингибирует процесс репликации ВИЧ, изолированных от клеточных линий [12, 21].

Противовирусная активность амфотерицина В проявляется и в случае гепатита В [14]. Обработка частиц вируса гепатита В раствором амфотерицина В в различной концентрации (в диапазоне 5–250 мкг/мл) показала, что ДНК-полимеразная активность вируса гепатита В растёт с увеличением концентрации антибиотика, которые затем трансформируются в менее активные субчастицы. При этом антиген вируса гепатита В теряет свои свойства [14].

Амфотерицин В и его метиловый эфир увеличивают выработку интерферона, которые препятствуют проникновению вирусов и их действию в клетках. Антибиотики усиливают работу полирибосомной кислоты, которая связана с обра-

зованием интерферона [14, 19]. Амфотерицин В значительно ускоряет начальную фазу ингибирования вирусной инфекции в клетках Vero и назальных эпителиальных клетках человека, а также вирусного эндоцитоза в эндосомах [16]. Более поздние эндосомы, заражённые вирусом и затем подверженные действию амфотерицина В, перестают распространяться. Предполагается, что ингибирующее действие амфотерицина В на репликацию вируса гриппа в клетках Vero, скорее всего связано с повышением эндосомального pH. Вероятно, амфотерицин В принимает участие в модуляции клеточного pH путём действия на протонные АТФ-азы. pH клеток и эндосом регулируется активностью протонных каналов в вирусной АТФ-азе. В клетках Vero и эпителия носа человека активность вирусной АТФ-азы очень велика. Связанная с поверхностной мембраной вирусная АТФ-аза поддерживает более щелочной pH среды по сравнению с другими клетками. Изменение кислотности создаёт более оптимальные условия для подавления эндосомальной вирусной инфекции. В носовых эпителиальных клетках происходит быстрое окисление слизистой оболочки дыхательных путей. Поскольку амфотерицин В снижает активность АТФ-азы, его добавление к клеткам Vero и назальному эпителию человека, может привести к быстрому снижению pH в эндосомах и, следовательно, к снижению инфекционности.

Амфотерицин В и филипин — наиболее эффективные из ПА действуют на вирус гриппа и другие оболочечные вирусы, такие как вирус везикулярного стоматита и вирус лейкемии Раушера [10]. Морфологические изменения, индуцированные филипином в вирусах гриппа и Раушера, отличались от вирионов ВВС. Инфекционность обработанных филипином ВВС-вирионов снижалась до 500 раз, тогда как вирионы гриппа были устойчивы к обработке филипином.

ПА чувствительны к холестеринсодержащим мембранам. С помощью спектроскопического анализа было показано образование комплексов ПА-стерин [3, 6, 22]. Было зафиксировано комплексообразование филипина, леворина, нистатина и этрускомицина со стеринным компонентом при заражении клеточных культур вирусом гриппа (штамм WSN; клеточные культуры FL-клетки амниона человека и КФ-клетки куриных фибробластов).

Некоторые ПА обладают способностью избирательно подавлять грибковые и вирусные инфекции растений [17–18, 23]. Так, обработка леворином овощных культур приводит к уничтожению вирусной и грибковой инфекции. В частности, леворин обладает способностью подавлять рост вируса табачной мозаики [18]. После действия леворином инфицированные растения

не только излечиваются, но и происходит их полная регенерация. Предполагается, что в основе механизма действия леворина лежит формирование молекулярного комплекса при взаимодействии с цитоплазматическими мембранами клеток. Леворин ингибирует репродукцию вируса и грибковых клеток, способствуя подавлению инфекций в овощных и других видах сельскохозяйственных культур [23]. При относительно малой концентрации (10^{-6} М) леворин обладает высокой эффективностью действия.

На основании вышеизложенных фактов можно предложить механизм взаимодействия вирус–клетка–ПА. Сравнивая морфологию вирусов и механизм проникновения вирусов в клетку (см. рис. 1 и рис. 2), необходимо выделить две основные стадии для РНК-содержащих и ДНК-содержащих вирусов. Выше отмечалось, что для вирусов гепатита и СПИДа характерна обратная транскрипция. В случае РНК-содержащих вирусов, на примере вируса гриппа можно представить механизм взаимодействия с амфотерицином В. При распространении вирусной инфекции характерно формирование новых вирионов, которые покидают клетку-хозяина и внедряются в другие аналогичные клетки. Образование вирионов представляет собой последний этап репродукции вируса. Адсорбция вируса переходит в стадию эндосом–эндоцитозных везикул, заполненных вирусом. В эндосоме происходит уменьшение рН и изменения в структуре белковой молекулы гемагглютинина в оболочке вируса, что приводит к появлению амфифильных доменов (новых поверхностных структур). В результате мембрана эндосомы и внешняя оболочка вируса сливаются. Амфотерин В действует на этой стадии в качестве ингибитора. Он принимает участие в модуляции клеточного рН, воздействуя на протонные АТФ-азы, снижая активность этого фермента. Кислотность клетки

и эндосом регулируется активностью протонных каналов в вирусной АТФ-азе. Под действием амфотерицина В меняется эндосомальная кислотность и повышается рН. Это приводит к потере вирусной активности и снижению инфекционности. Вирус активируется в кислой среде, а в щелочной теряется его инфекционность.

В случае ДНК-содержащих вирусов при действии амфотерицина В в концентрации 5–250 мкг/мл увеличивается активность ДНК-полимеразы вируса гепатита В, которая растёт с увеличением концентрации антибиотика [14]. При этом антигены вируса гепатита В становятся менее активными. Здесь можно провести аналогию с действием амфотерицина В на вирус гриппа в клеточной культуре эпителиальных клеток Vero (почечные клетки африканской зелёной обезьяны) и эпителия носа человека, где на первой стадии амфотерин В способствует репликации вируса гриппа, но затем процесс инфицирования приостанавливается благодаря действию протонной АТФ-азы в эндосоме и изменению кислотности в эндосомальной жидкости [16].

Для вируса гепатита В показано, что нативный амфотерин В и метиловый эфир амфотерицина В действуют на активность полирибоситидиловой кислоты и на образование интерферона, что, в свою очередь, блокирует процесс репродукции вируса гепатита *in vitro* [19].

Таким образом, анализ экспериментальных данных, представленных для РНК-содержащих и ДНК-содержащих вирусов показывает эффективность противовирусного действия ПА, которые ингибируют процесс репродукции вирусов в клетках. Чтобы детально исследовать механизм ингибирования репликации вирусов требуется продолжение экспериментальной работы на различных вирусах и клеточных культурах с использованием новых ПА и их производных, созданных путём химической модификации молекул и генно-инженерных работ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чизмаджев Ю.А. Как вирус проникает в клетку. Природа. — 2003. — № 4. — С. 69–74. / *Chizmadzhev Yu.A. Kak virus pronikaet v kletku. Priroda* 2003; 4: 69–74. [in Russian]
2. Киселев О.И., Жилинская И.Н. Вопросы общей вирусологии. Санкт-Петербург, 2007 — 376 с. / *Kiselev O.I., Zhilinskaya I.N. Voprosy obshchei virusologii. Sankt-Peterburg*, 2007; 376. [in Russian]
3. Касумов Х.М. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. М.: Наука, 2009. — 510 с. / *Kasumov Kh.M. Struktura i membrannaya funktsiya polienovykh makrolidnykh antibiotikov. M.: Nauka*, 2009; 510. [in Russian]
4. Cohen B.E. Amphotericin B Membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J Membrane Biol* 2010; 238; 1–20.
5. Соловьева С.Е., Олсуфьева Е.Н., Преображенская М.Н. Химическое модифицирование противогрибковых макролидных полиеновых антибиотиков. Успехи химии. — 2011. — Т. 80. — № 2. — С. 115–138. / *Solov'eva S.E., Olsuf'eva E.N., Preobrazhenskaya M.N. Khimicheskoe modifizirovanie protivogribovykh makrolidnykh polienovykh antibiotikov. Uspekhi khimii* 2011; 80: 2: 115–138. [in Russian]
6. Gray K.C., Palacios D.S., Dailey I., Endo M.M., Uno B.E., Wilcock B.C., Burke M.D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109: 2234–2239.
7. Ermishkin L.N., Kasumov Kh.M., Potseluyev V.M. Properties of amphotericin B channels in a lipid bilayers. *Nature* 1976; 262 (5570): 698–769.
8. Samedova A.A., Tagi-zade T.P., Kasumov Kh.M. Dependence of ion channel properties formed by polyene antibiotics molecules on the lactone ring structure. *Russian J. Bioorganic Chemistry* 2018; 44 (3): 333–345.
9. Вайнштейн В.А., Николаевич Л.Н., Султанова Г.Г., Багирова А.А., Пашазаде Т.Д., Гасимова В.Х. и др. Действие химически трансформированных макроциклических полиеновых антибиотиков на опухолевые клетки. Экспериментальная биология и медицина. — 2018. — № 166 (12). — С. 695–700. / *Vajnshteyn V.A., Nikolaevich L.N., Sultanova G.G., Bagirova A.A., Pashazade T.D., Gasimova V.Kh. i dr. Deystvie khimicheskii transformirovannykh makrotsiklicheski polienovykh antibiotikov na opukholevye kletki. Eksperimental'naya biologiya i meditsina* 2018; 166 (12): 695–700. [in Russian]
10. Majuk Z., Bittman R., Landsberger F.R., Compans R.W. Effects of filipin on the structure and biological activity of enveloped viruses. *J Virol* 1977; 24: 883–892.
11. Clayette P., Martin M., Beringue V., Dereuddre-Bosquet N., Adjou K.T., Seman M., Dominique Dormont D. Effects of MS-8209, an Amphotericin B derivative on tumor necrosis factor alpha synthesis and human immunodeficiency virus replication in macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44 (2): 405–407.

12. Waheed A.A., Ablan S.D., Soheilian F., Nagashima K., Ono A., Shaffner C.P., Freed E.O. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 assembly and release by the cholesterol-binding compound amphotericin B methyl ester: evidence for Vpu Dependence. *J Virol* 2008; 82: 9776–9781.
13. Xu F., Zhao X., Hu S., Li J., Yin L., Mei S. et al. Amphotericin B inhibits enterovirus 71 replication by impeding viral entry. *Sci Rep* 2016; 9 (6): 33150.
14. Kessler H.A., Dixon J., Howard C.R., Tsiquaye K., Zuckerman A.J. Effects of amphotericin B on hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 20 (6): 826–833.
15. Stevens N.M., Engle C.G., Fisher P.B., Mechlini W., Schaffner C.P. Antiherpetic activity of water soluble amphotericin b methyl ester. *ArchViro.*, 1975; 48: 391–394.
16. Roethl E., Gassner M., Krenn B.M., Romanovskaya-Romanko E.A., Seper H., Romanova J., Nakowitsch S. et al. Antimycotic-antibiotic amphotericin B promotes Influenza virus replication in cell culture. *J Virol* 2011; 85: 11139–11145.
17. Гусейнова И.М., Султанова Н.Ф., Маммадов А.Ч., Алиев Д.А. Вирусные заболевания, поражающие овощные культуры в Азербайджане. Баку, 2012. — 118 с. / Guseynova I.M., Sultanova N.F., Mammadov A.Ch., Aliyev D.A. Virusnye zabolevaniya, porazhayushchie ovoshchnye kul'tury v Azerbajdzhanе. Baku, 2012; 118. [in Russian]
18. Ибрагимова В.Х., Самедова А.А., Султанова Г.Г., Касумов Х.М. Антигрибковое и противовирусное действие антибиотика ИНФАНВИР при заболевании овощных культур. Доклады Национальной Академии Наук Азербайджана, серия биологические науки. 2012. — Т. 67. — № 2. — С. 34–37. / Ibragimova V.Kh., Samedova A.A., Sultanova G.G., Kasumov Kh.M. Antigrivkovoe i antivirusnoe dejstvie antibiotika INFANVIR pri zabolevanii ovoshchnykh kul'tur. Doklady Natsional'noj Akademii Nauk Azerbajdzhana, seriya biologicheskie nauki 2012; 67: 2: 34–37. [in Russian]
19. Jordan G., Seet E.C. Antiviral effects of amphotericin B methyl ester, *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 199–204.
20. Pleskoff O., Seman M., Alizon M. Amphotericin B derivative blocks human immunodeficiency virus type 1 entry after CD4 binding: effect on virus-cell fusion but not on cell-cell fusion. *J Virol* 1995; 69: 570–574.
21. Scheller C., Sopper S., Chen P., Flory E., Koutsilieri E., Racek T. et al. Caspase inhibition activates HIV in latently infected cells. Role of tumor necrosis factor receptor 1 and CD95. *J Biol Chem* 2002; 27: 18: 15459–15464.
22. Самедова А.А., Касумов Х.М. Механизм действия макролидного полиенового антибиотика филипина на клеточные и липидные мембраны. Антибиотики и химиотер. — 2009. — Т. 54. — № 11–12. — С. 41–52. / Samedova A.A., Kasumov Kh.M. Mekhanizm dejstviya makrolidnogo polienovogo antibiotika filipina na kletochnye i lipidnye membrany. Antibiotiki i khimioter 2009; 54: 11–12. — S. 41–52. [in Russian]
23. Ibragimova V.Kh., Samedova A.A., Sultanova G.G., Gasimov Kh.M. The antiviral and antifungal action of INFANVIR antibiotic at the vegetable crops. The First International Conference on Biology and Medical Sciences. 2014, Austria, Vienna. 45–50.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Багирова Арифа Али Гасановна — к. б. н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории Биофизика клетки Института ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

Гусейнова Ирада Мамедовна — д. б. н., академик Национальной Академии Наук Азербайджана, директор Института молекулярной биологии и биотехнологий Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

Гафар-заде Марьям Фикретовна — аспирант Института молекулярной биологии и биотехнологий Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

Касумов Халил Мамедалиевич — д. б. н., главный научный сотрудник лаборатории Биофизика клетки Института ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

Вакцинация в ревматологии: новые данные (по материалам рекомендаций Европейской антиревматической лиги — EULAR)

*Б. С. БЕЛОВ, Г. М. ТАРАСОВА, Н. В. МУРАВЬЕВА

ФГБНУ НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, Москва

Vaccination In Rheumatology: New Data (Based on Recommendations of The European League Against Rheumatism)

*B. S. BELOV, G. M. TARASOVA, N. V. MURAVYOVA

V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow

В современной ревматологии коморбидные инфекции оказывают значительное влияние на морбидность и летальность, особенно при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях (ИВРЗ). В связи с этим всё большее значение в профилактике инфекций при ИВРЗ приобретает вакцинация. В настоящей статье проанализирован обновлённый вариант рекомендаций по вакцинации взрослых больных с ИВРЗ, предложенный экспертами Европейской антиревматической лиги (EULAR) в конце 2019 г. Обсуждается безопасность и иммуногенность вакцинации, связанной с предупреждением различных инфекций у больных ИВРЗ. Обозначены основные направления будущих исследований по рассматриваемой проблеме.

Ключевые слова: иммуновоспалительные ревматические заболевания, грипп, пневмония, вирус папилломы человека, жёлтая лихорадка, вакцинация, рекомендации.

Comorbid infections have a significant effect on morbidity and mortality in modern rheumatology, especially in immune-mediated inflammatory rheumatic diseases (IMIRD). In this regard, vaccination is becoming increasingly important in the prevention of infections in IMIRD. The article analyzes an updated version of the recommendations for vaccination of adult patients with IMIRD, proposed by experts of the European League Against Rheumatism at the end of 2019. The safety and immunogenicity of vaccination associated with the prevention of various infections in patients with IMIRD are discussed. The main directions of future research on this issue are outlined.

Keywords: immune-mediated inflammatory rheumatic diseases, influenza, pneumonia, human papillomavirus, yellow fever, vaccination, recommendations.

В современном мире проблема инфекционных заболеваний сохраняет свою значимость как в общемедицинском, так и социальном аспектах. Это обусловлено динамикой естественных и антропогенно детерминированных природных процессов, изменяющейся нозологической структурой инфекционных болезней, интенсификацией международных связей и туристических потоков и т. д. Инфекция по-прежнему остаётся одной из ведущих причин смерти в странах с различным уровнем развития экономики.

В ревматологии инфекции оказывают значительное влияние на морбидность и летальность, особенно при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях (ИВРЗ). Так, частота серьёзных, т. е. требовавших госпитализации инфекций (СИ) на фоне ИВРЗ у стационарного контингента пациентов, госпитализированных в ФГБНУ НИИ ревматологии им. В.А. Насоновой в течение

1 года, составила 38,1% среди больных системной красной волчанкой (СКВ), 26,2% — системной склеродермией (ССД), 23,7% — ревматоидным артритом (РА). Наиболее частой СИ была пневмония — у пациентов с РА — 62,9%, ССД — 62,5%, СКВ — 61,9% [1]. Наряду с нарушениями иммунитета, обусловленными фоновой ревматической патологией, значимую роль в развитии СИ играет иммуносупрессивная терапия. В связи с вышеизложенным всё большее значение в профилактике инфекций при ИВРЗ приобретает вакцинация.

Недавно на сайте журнала «Annals of rheumatic diseases», являющегося печатным органом Европейской антиревматической лиги (EULAR), комитетом экспертов был опубликован обновлённый вариант рекомендаций по вакцинации взрослых больных с ИВРЗ [2]. В предисловии авторами подчёркивается особая важность вакцинации для больных ИВРЗ, поскольку при этом, в первую очередь, снижается частота госпитализаций, обусловленных СИ, включая инвазивные формы последних. Популяция больных ИВРЗ

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 115522 Москва, Каширское шоссе д. 34А. НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой. E-mail: belovbor@yandex.ru

Таблица 1. Основополагающие принципы вакцинации взрослых больных ИВРЗ

1. Вакцинальный статус и показания к дальнейшей вакцинации больных ИВРЗ следует оценивать ежегодно консилиумом ревматологов (rheumatology team)
2. Индивидуальная программа вакцинации должна быть разъяснена больному консилиумом ревматологов, обеспечивая основу для совместного принятия решений, и реализовываться коллегиально врачом первичного звена, консилиумом ревматологов и пациентом
3. Вакцинацию больных с ИВРЗ следует назначать преимущественно в период неактивной фазы болезни
4. Вакцины следует назначать преимущественно до планируемой иммуносупрессии, в частности анти-В-клеточной терапии
5. Инактивированные вакцины могут быть назначены на фоне терапии ГК и БПВП/ГИБП
6. Живые аттенуированные вакцины больным с ИВРЗ назначаются с осторожностью

Примечание. ГК — глюкокортикоиды; БПВП — базисные противовоспалительные препараты; ГИБП — генно-инженерные биологические препараты.

Таблица 2. Рекомендации по вакцинации взрослых больных ИВРЗ

1. Вакцинацию против гриппа следует настоятельно рекомендовать большинству больных ИВРЗ
2. Вакцинацию против пневмококковой инфекции следует настоятельно рекомендовать большинству больных ИВРЗ
3. Больные с ИВРЗ должны получать вакцинацию против столбняка в соответствии с рекомендациями для общей популяции. Пассивную иммунизацию следует рассматривать для больных, получающих анти-В-клеточную терапию
4. Вакцинацию против гепатитов А и В следует назначать больным ИВРЗ из группы риска (путешествие или проживание в эндемичных регионах, медицинский персонал, инфицированные домочадцы, в/в наркомания, гомосексуализм). В случаях верифицированного контакта с инфекцией, обусловленной вирусом гепатита В (инфицированные иглы, укушенные раны и т.д.), показана бустерная вакцинация или пассивная иммунизация
5. Вакцинация против *Herpes zoster* может быть рассмотрена для больных ИВРЗ из групп высокого риска (ДМ/ПМ и СКВ) в любом возрасте
6. Назначения вакцинации против жёлтой лихорадки больным с ИВРЗ следует избегать в большинстве случаев
7. Больные ИВРЗ, в частности пациенты с СКВ должны получать вакцинацию против ВПЧ в соответствии с рекомендациями для общей популяции
8. Иммунокомпетентные члены семей больных ИВРЗ должны получать вакцинацию в соответствии с национальными рекомендациями, исключая пероральные вакцины против полиомиелита
9. Следует избегать назначения живых аттенуированных вакцин в течение первых 6 мес. жизни детям, рождённым от матерей, пролеченных ГИБП в течение 2-й половины беременности

Примечание. ДМ/ПМ — дерматомиозит/полимиозит; ВПЧ — вирус папилломы человека.

повсеместно страдает от недостаточного (субоптимального) охвата вакцинацией, отчасти из-за низкой частоты направления пациентов со стороны врачей. Так, в исследовании германских авторов частота охвата вакцинацией против гриппа среди больных РА составила 20%, СКВ — 19,5%, аксиальными спондилоартропатиями — 11,7%, псориатическим артритом (ПсА) — 15,2%; против пневмококковой инфекции — 30,4, 29,3, 22,8 и 19,7%, соответственно [3]. В работе канадских исследователей врачебная рекомендация являлась наиболее мощным независимым фактором, влияющим на охват вакцинацией против указанных инфекций ($p < 0,001$) [4]. Анализ базы данных американской государственной программы Medicaid показал, что 93% случаев госпитализаций среди непривитых пациенток с СКВ обусловлены инфекциями, которые можно было бы предотвратить с помощью вакцинации [5]. Указанные данные подчеркивают необходимость дальнейших мероприятий, направленных на распространение информации о вакцинации в ревматологическом сообществе и среди врачей смежных специальностей.

Комитетом экспертов EULAR были сформулированы 6 основополагающих принципов (табл. 1) и 9 рекомендаций (табл. 2) по различным аспектам вакцинации при ИВРЗ.

Основополагающие принципы

В представленных рекомендациях большое значение придаётся ежегодной оценке вакцинального статуса (вакцинальный анамнез, данные о нежелательных реакциях и т. д.) и показаний для дальнейшей вакцинации. Этот процесс осуществляется ревматологическим консилиумом (rheumatology team), состоящим из специалистов, обладающих обширными знаниями и опытом, охватывающим все аспекты ИВРЗ, включая соответствующие методы лечения, применимые к данному пациенту. В обязанности ревматологического консилиума также входят контроль ведения больных ИВРЗ, связь с врачами первичного звена и при необходимости координирование междисциплинарных вопросов. Особо подчёркивается необходимость включения оценки вакцинального статуса в стандарты курации больных ИВРЗ.

Впервые в рекомендациях EULAR получил отражение принцип совместного принятия решений с учётом потребностей, проблем и предпочтений пациентов относительно вакцинации. Выявление препятствий, устранение страхов и опасений больных в отношении нежелательных реакций является важным шагом на пути к выполнению любой программы иммунизации. Имея доступ к научно обоснованной информа-

ции о вакцинах, понимая риски и преимущества вакцинации, пациенты могут принять взвешенное решение относительно предполагаемого плана иммунизации. Считается, что, принимая решение, больной двигается по направлению от информированности к осознанию необходимости иммунизации («...мудрый больной — союзник врача»). Ревматологический консилиум должен информировать пациентов о риске инфекций и показаниях к вакцинации, о соотношении риск/польза конкретной вакцины, а также рекомендовать соблюдение соответствующего графика вакцинации. Опросы среди больных ИВРЗ показали, что более обширная информация и наличие рекомендации от лечащего врача повышали приверженность больных к вакцинации [6, 7].

Третьим основополагающим принципом является предпочтительное проведение вакцинации в неактивную фазу фонового ИВРЗ. На наш взгляд, данное положение, основанное на теоретических рисках обострения болезни после иммунизации у нестабильных больных с ИВРЗ, является в достаточной степени дискуссионным. Так, в работе, включавшей 340 больных РА, высокая активность болезни не препятствовала иммунному ответу на моновалентную вакцину против гриппа H1N1 [8]. По данным исследования, выполненного в ФГБНУ НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, преобладание больных РА со средней и высокой степенью активности (84,7%) на исходном этапе, а также продемонстрированная значимая положительная динамика индекса DAS 28 на протяжении годичного периода наблюдения позволяют вести речь о безопасности пневмококковой вакцинации, выполненной не только в неактивной стадии болезни, но и на фоне активного воспалительного процесса [9]. В другом нашем исследовании было показано, что иммуногенность ППВ-23 не зависела от степени активности СКВ. Развитие значимых неблагоприятных реакций при вакцинации больных с высокой и средней активностью СКВ не отмечено. Данный факт снимает какие-либо ограничения в вакцинации при необходимости таковой у пациентов с высокой активностью болезни, например перед началом планируемой терапии анти-В-клеточными ГИБП [10]. Необходимо заметить, что эксперты EULAR не исключают возможность вакцинации у больных с активной стадией болезни, но при этом решение должно приниматься с учётом особенностей каждого конкретного случая.

Принцип преимущественного назначения вакцинации до планируемой иммуносупрессивной терапии, несомненно, оправдан, но в реальной клинической практике в абсолютном большинстве случаев не соблюдается по ряду причин (трудности подбора лечения на начальном этапе, плохая переносимость препаратов, вышеупомя-

нутое негативное отношение врачей к вакцинации и др.). Кроме того, соблюдение этого принципа ни в коей мере не должно препятствовать ранней инициации иммуносупрессивной терапии в тяжёлых клинических случаях. Несмотря на то что большинство БПВП и ГИБП имеют переменное влияние на постиммунизационный ответ, у большинства пациентов удаётся добиться удовлетворительного результата. В то же время анти-В-клеточные препараты обладают выраженным ингибирующим влиянием на концентрацию постиммунизационных антител. Поэтому при планировании данной терапии больным ИВРЗ вакцинацию назначают до начала лечения. Если же такое лечение уже проводится, то вакцинацию необходимо выполнить как минимум через 6 мес. после начала анти-В-клеточной терапии, но не менее чем за 4 нед. до следующего курса. При невыполнимости этих условий вакцинацию можно назначить на фоне анти-В-клеточной терапии, принимая во внимание возможный субоптимальный (недостаточный) уровень постиммунизационного ответа.

Достаточная эффективность и безопасность инактивированных (убитых) вакцин, применяемых у пациентов с разнообразными ИВРЗ на фоне иммуносупрессивной терапии (кроме анти-В-клеточных препаратов), подтверждены данными, накопленными в течение последних лет. К указанным вакцинам относятся гриппозные, пневмококковые, противостолбнячные, а также вакцины против гепатитов А/В и вируса папилломы человека (ВПЧ). Применение этих вакцин позволяло достичь адекватных уровней иммуногенности при отсутствии новых данных в отношении безопасности, хотя катамнестический период в этих исследованиях был коротким [11–13].

Необходимо отдельно остановиться на вопросе назначения живых аттенуированных вакцин ревматологическим пациентам. В целом у больных ИВРЗ, получающих иммуносупрессивную терапию, назначение вышеуказанных вакцин не рекомендуется, т. к. последние содержат живые микроорганизмы, которые теоретически могут быть причиной инфекции у иммунокомпрометированных пациентов. Основываясь на мнении экспертов, такие вакцины следует назначать за 4 нед. до инициации иммуносупрессивной терапии либо у пациентов с низкой степенью иммуносупрессии. В соответствии с рекомендациями Американского общества инфекционных болезней (IDSA), к пациентам с низкой степенью иммуносупрессии относят таковых, получающих следующие терапевтические схемы: глюкокортикоиды (ГК) в дозах <20 мг/сут или <2 мг/кг/сут по преднизолону в течение < 2 нед., метотрексат (МТ) $<0,4$ мг/кг/нед, азатиоприн $<3,0$ мг/кг/сут, 6-меркаптопурин $<1,5$ мг/кг/сут. [14]. С ревмато-

логических позиций к этой же группе относят пациентов, не получающих таргетные базисные противовоспалительные препараты (БПВП) и генно-инженерные биологические препараты (ГИБП).

В отношении вакцин против кори, паротита и краснухи (measles, mumps and rubella — MMR), а также *Herpes zoster* (HZ), вероятно могут быть сделаны исключения. Так, в ретроспективном сравнительном исследовании, включавшем 400 больных ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА), получавших MMR-вакцину, наблюдали стойкую и длительную серопротекцию по кори. При этом терапия ГК или МТ не оказывала значимого влияния на средние геометрические уровни патоген-специфических антител или показатели серопротекции [15]. В рандомизированном открытом исследовании голландских авторов подтверждена достаточная иммуногенность и безопасность бустерной MMR-вакцинации у 131 больного ЮИА, из которых 60 получали МТ, 15 — ГИБП. Следует подчеркнуть, что перед вакцинацией лечение ГИБП прерывали на срок, равный 5 периодам полувыведения для каждого конкретного препарата [16]. Основываясь на этих данных, эксперты EULAR полагают, что, бустерная вакцинация против кори (в отличие от первичной иммунизации) может быть рассмотрена у больных ИВРЗ с низким уровнем иммуносупрессии при риске заражения данной инфекцией (например, при путешествиях). Данные по безопасности вакцинации против HZ у больных ИВРЗ обсуждаются ниже.

Рекомендации

В настоящее время накоплен большой опыт применения вакцин против гриппа у больных с различными ИВРЗ, в т.ч. получающих терапию БПВП и ГИБП. Применение субъединичной трёхвалентной вакцины против сезонного гриппа у больных ИВРЗ повлекло за собой снижение частоты данной инфекции и её бактериальных осложнений, госпитализации и летальности [17–19]. Данная вакцина была иммуногенной у больных ИВРЗ при лечении противовоспалительными препаратами всех классов, исключая ритуксимаб (РТМ) [20–23]. Анализ крупнейшей базы данных Министерства здравоохранения Великобритании (Clinical Practice Research Datalink) не выявил взаимосвязи между иммунизацией инактивированной гриппозной вакциной и обращаемостью к врачам первичного звена по поводу обострения РА, появления лихорадочного синдрома или развития васкулита. По мнению авторов, эти данные служат убедительным подтверждением безопасности вакцинации против гриппа у больных ИВРЗ [24]. Несмотря на то что временная отмена МТ, по-видимому, повышала иммуногенность сезонной гриппозной вакцины [25], комитет экспертов не считает

нужным прерывать лечение этим препаратом при указанной вакцинации.

В абсолютном большинстве работ применение сезонной и пандемической гриппозных вакцин не приводило к обострению фонового ИВРЗ, а частота и тяжесть нежелательных явлений были сопоставимы со здоровым контролем [26–31]. Так, в исследовании, выполненном в ФБГНУ НИИР им. В. А. Насоновой и включавшем 126 испытуемых лиц (РА-52, анкилозирующий спондилит-АС-34, контроль-40), продемонстрирована полная клиническая эффективность трёхвалентной инактивированной сплит-вакцины против гриппа и положительная иммунная реакция на неё. Доля «ответчиков» на вакцину среди больных составила 70%, в контроле — 75%. Проводимая терапия ингибиторами фактора некроза опухоли- α (иФНО- α) и МТ не оказывала значимого влияния на поствакцинальный ответ. У большинства обследованных (77,4%) отмечено бессимптомное течение поствакцинального периода. Локальные реакции и общие реакции слабой степени выраженности имели место в 15 и 7,6% случаев, соответственно. Это были типичные поствакцинальные реакции, которые претерпели обратное развитие в течение суток без дополнительных корректирующих мероприятий. За весь период наблюдения обострения РА или АС либо развития новых клинически значимых аутоиммунных феноменов не наблюдали ни в одном случае [32].

Как уже отмечалось выше, риск пневмококковой инфекции особенно высок для больных ИВРЗ. По данным крупного когортного американского исследования [33], для больных РА максимальная частота госпитализаций, связанных с СИ, была обусловлена пневмонией — 37%. При анализе административной базы данных страхового медицинского обслуживания, РА и СКВ идентифицированы как состояния риска пневмонии, а также иных инвазивных пневмококковых болезней (ИПБ). По сравнению со здоровым контролем, относительный риск пневмококковой пневмонии составил 4,4 (95% ДИ 3,8–5,2) для больных РА и 4,3 (95% ДИ 3,8–4,7) — СКВ. Максимальный риск развития ИПБ, составивший 7,1 (95% ДИ 4,9–10,1), выявлен у больных в возрасте 18–49 лет [34].

На сегодняшний день доступны 23-валентная пневмококковая полисахаридная (ППВ-23) и 13-валентная пневмококковая конъюгированная (ПКВ-13) вакцины. В ретроспективном исследовании, включавшем 152 больных РА, получавших МТ, показано, что среди невакцинированных от пневмококковой инфекции пациентов риск развития пневмонии возрастал в 9,7 раза по сравнению с вакцинированными [35]. Высокая иммуногенность и безопасность ППВ-23 продемонстрированы при РА, СКВ и других

ИВРЗ [36–39], в т. ч. в исследованиях, выполненных в ФБГНУ НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой [40–42].

В соответствии с рекомендациями Американского комитета по практике иммунизации (Advisory Committee on Immunization Practices) [43], Федеральными клиническими рекомендациями РФ [44], вакцинацию взрослых больных, получающих иммуносупрессивную терапию, необходимо начинать с ПКВ-13, после которой не менее, чем через 8 нед. может быть введена ППВ-23, вторая доза ППВ-23 через 5 лет. Однако подобный подход к вакцинопрофилактике пневмококковых инфекций у взрослых пациентов ревматологического круга весьма неоднозначен, он требует дальнейшего изучения и подтверждения его целесообразности в ходе соответствующих клинических исследований, что уже подчеркивалось нами ранее на страницах настоящего журнала [45].

Наряду с вышеуказанным остаётся нерешённым вопрос о длительности поддержания протективного эффекта пневмококковых вакцин и, следовательно, сроках ревакцинации у больных ИВРЗ. По данным израильских исследователей, ревакцинация ППВ-23, возможно, требуется не всем ревматологическим пациентам, т. к. в отдельных случаях ответ на вакцину сохранялся более 10 лет [46]. В ходе выполненного в ФБГНУ НИИР им. В. А. Насоновой 5-летнего проспективного наблюдения отмечена достаточная и длительная иммуногенность ППВ-23 у больных РА. Значимое повышение поствакцинального ответа сохранялось на протяжении указанного периода у 78% больных. Клиническая эффективность вакцинации (94,4%) расценена как высокая. Обострений РА, ассоциированных с вакцинацией, а также новых аутоиммунных феноменов не выявлено [47].

По мнению экспертов EULAR, вакцинацию против пневмококковой инфекции следует настоятельно рекомендовать для большинства больных ИВРЗ. В то же время, как подчёркивают авторы, «...нет оснований рекомендовать конкретную политику в отношении определённой пневмококковой вакцины на основе имеющихся данных об эффективности, иммуногенности и безопасности. Определённую роль в принятии решения о выборе вакцины может играть её стоимость».

У больных РА и СКВ продемонстрирован удовлетворительный иммунный ответ на противостолбнячную вакцину, сопоставимый со здоровым контролем [48, 49]. Однако, по мнению экспертов, в случаях высокой вероятности контакта со столбнячной инфекцией больных, получающих анти-В-клеточную терапию, экстраполируя данные из других исследований, целесообразна пассивная иммунизация противостолбнячным иммуноглобулином.

Вакцинация против вирусного гепатита А (ВГА) показана серонегативным по ВГА больным ИВРЗ, путешествующим или проживающим в эндемичных регионах. В отличие от выраженной иммуногенности у здоровых лиц однократная доза ВГА-вакцины, по-видимому, не обеспечивает достаточную иммунную защиту при РА [50] и у больных, получающих иммуносупрессивную терапию [51]. У этих пациентов рекомендуется повторная ВГА-вакцинация через 6 мес. и определение уровней поствакцинальных антител.

Вакцинацию против вирусного гепатита В (ВГВ) назначают только серонегативным по ВГВ больным ИВРЗ из групп риска (путешествие или проживание в эндемичных регионах, медицинский персонал, инфицированные домочадцы или сексуальные партнёры, в/в наркомания, гомосексуализм). В случаях верифицированного контакта с ВГВ-инфекцией (инфицированные иглы, укушенные раны и т. д.) показана бустерная вакцинация или пассивная иммунизация.

Принимая во внимание данные двух крупных исследований по эффективности и безопасности иммунизации более 450 тыс. больных ИВРЗ (в т. ч. 633 случая терапии ГИБП — преимущественно иФНО- α) [52,53], применение живой вакцины против HZ-инфекции может рассматриваться для этих пациентов. Важно отметить, что в марте 2018 г. в Европе была лицензирована рекомбинантная субъединичная вакцина против HZ-инфекции (Shingrix), которая после проведения клинических исследований, вероятно, заменит живую вакцину у больных ИВРЗ.

Вакцинация против жёлтой лихорадки для больных ИВРЗ в целом не показана вследствие риска индукции активной инфекции. В случае необходимости поездки в эндемичный регион (или проживании в нём), больным ИВРЗ перед вакцинацией рекомендуется временно прекратить терапию иммуносупрессивным средством на определённый срок с учётом фармакокинетики препарата.

В ходе крупных популяционных исследований показана высокая иммуногенность и безопасность ВПЧ-вакцины у девушек и женщин с фоновыми аутоиммунными заболеваниями. Исследование случай–контроль, посвящённое ВПЧ-вакцинации больных СКВ, продемонстрировало одинаковую частоту обострений в вакцинированной и невакцинированной группах пациенток [54–56]. По данным крупного когортного исследования, выполненного в Швеции, значимых ассоциаций ВПЧ-вакцинации с обострением фонового аутоиммунного заболевания не выявлено [57].

Иммунокомпетентные родственники, проживающие с больными ИВРЗ, могут получать иммунизацию инаktivированными и живыми вакцинами в соответствии с национальными рекомен-

дациями. Исключением является пероральная вакцина против полиомиелита из-за риска (хотя и минимального) трансмиссии возбудителя, содержащегося в вакцине, от носителя к иммунокомпрометированному больному ИВРЗ. Пациентам с высокой степенью иммуносупрессии не следует контактировать с новорожденными, вакцинированными против ротавирусной инфекции, как минимум, в течение 4 мес. Эти же больные должны избегать контактов с лицами, у которых имеются поражения кожи, развившиеся после НЗ-вакцинации.

У детей, рожденных от матерей, получавших ИФНО- α во 2-й половине беременности, следует избегать назначения живых аттенуированных вакцин в течение первых 6 мес. жизни [58–60]. В случае если женщина получала указанные препара-

ты в сроки до 22 нед. беременности, вакцинация новорожденных осуществляется в соответствии со стандартными протоколами, включая живые вакцины [61].

В заключение эксперты EULAR подчеркивают, что в эпоху персонифицированной медицины необходимы дальнейшие исследования, призванные оптимизировать стратификацию индивидуального риска инфекций и, таким образом, решать вопросы вакцинопрофилактики для каждого конкретного больного ИВРЗ с максимальной пользой.

Настоящая статья подготовлена в рамках НИР по теме «Коморбидные инфекции при ревматических заболеваниях и проблемы безопасности антиревматической терапии» (AAAA-A19-119021190148-3, 0514-2019-0005).

ЛИТЕРАТУРА

1. Буханова Д.В., Белов Б.С., Тарасова Г.М. и др. Коморбидные инфекции при ревматических заболеваниях (по данным ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой). Медицинский совет. — 2019. — № 9. — С. 86–91. / *Buhanova D.V., Belov B.S., Tarasova G.M. et al. Comorbid infections in rheumatic diseases (according to FSBI RIR named after V.A. Nasonova). Meditsinskyi sovet 2019; 9: 86–91 [In Russian].*
2. Furer V., Rondaan C., Heijstek M.W. et al. 2019 update of EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2020; 79 (1): 39–52. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215882.
3. Kiltz U., Celik A., Tsiami S. et al. Gaps in Patient Safety Performance in Patients with Immunosuppressive Therapy: Results of Screening for Infections and Vaccination Status in a Large Real-life Cohort [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2019; 71 (Suppl 10), abstr.264.
4. Qendro T., de la Torre M.L., Panopalis P. et al. Suboptimal Immunization Coverage among Canadian Rheumatology Patients in Routine Clinical Care. *J Rheumatol* 2019 Jul 15. Published online December 1, 2019. doi: 10.3899/jrheum.181376
5. Feldman C., Xu C., Costenbader K. Avoidable Acute Care Use for Vaccine-Preventable Illnesses Among Medicaid Beneficiaries with Lupus: Demographic and Healthcare Utilization Differences [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2019; 71 (Suppl 10). abstr.951.
6. Nguyen M., Lindegaard H., Hendricks O., Friis-Møller N. Factors associated with influenza and pneumococcal vaccine uptake among rheumatoid arthritis patients in Denmark invited to participate in a pneumococcal vaccine trial (Immunovax_RA). *Scand J Rheumatol* 2017; 46 (6): 446–453.
7. Loubet P., Kernéis S., Groh M. et al. Attitude, knowledge and factors associated with influenza and pneumococcal vaccine uptake in a large cohort of patients with secondary immune deficiency. *Vaccine* 2015; 33 (31): 3703–3708.
8. Ribeiro A.C.M., Guedes L.K.N., Moraes J.C.B. et al. Reduced seroprotection after pandemic H1N1 influenza adjuvant-free vaccination in patients with rheumatoid arthritis: implications for clinical practice. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 2144–2147.
9. Наумицева М.С., Белов Б.С., Александрова Е.Н. и др. Оценка иммуногенности и безопасности 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакцины у больных ревматическими заболеваниями. Научно-практическая ревматология. — 2015. — Т. 53. — № 6. — С. 586–590. / *Naumtseva M.S., Belov B.S., Aleksandrova E.N. et al. Assessment of the immunogenicity and safety of 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine in patients with rheumatic diseases. Nauchno-prakticheskaya revmatologiya=Rheumatology Science and Practice* 2015; 53 (6): 586–590 [In Russian].
10. Тарасова Г.М., Белов Б.С., Буханова Д.В. и др. Изучение иммуногенности и безопасности 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакцины у больных системной красной волчанкой. Научно-практическая ревматология. — 2018. — Т. 56. — № 4. — С. 433–438. / *Tarasova G.M., Belov B.S., Bukhanova D.V. et al. Investigation of immunogenicity and safety of 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine in patients with systemic lupus erythematosus. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya=Rheumatology Science and Practice* 2018; 56(4): 433–438. [In Russian].
11. Subesinghe S., Bechman K., Rutherford A.I. et al. A Systematic Review and Metaanalysis of Antirheumatic Drugs and Vaccine Immunogenicity in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 2018; 45 (6): 733–744.
12. Winthrop K.L., Silverfield J., Racewicz A. et al. The effect of tofacitinib on pneumococcal and influenza vaccine responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75 (4): 687–695.
13. Broyde A., Arad U., Madar-Balakirski N. et al. Longterm Efficacy of an Antipneumococcal Polysaccharide Vaccine among Patients with Autoimmune Inflammatory Rheumatic Diseases. *J Rheumatol* 2016; 43 (2): 267–272.
14. Rubin L.G., Levin M.J., Ljungman P. et al. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis* 2014; 58 (3): 309–318.
15. Heijstek M.W., van Gageldonk P.G., Berbers G.A. et al. Differences in persistence of measles, mumps, rubella, diphtheria and tetanus antibodies between children with rheumatic disease and healthy controls: a retrospective cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 2012; 71 (6): 948–954.
16. Heijstek M.W., Kamphuis S., Armbrust W. et al. Effects of the live attenuated measles-mumps-rubella booster vaccination on disease activity in patients with juvenile idiopathic arthritis: a randomized trial. *JAMA* 2013; 309 (23): 2449–2456.
17. Heijstek M.W., Kamphuis S., Armbrust W. et al. Effects of the live attenuated measles-mumps-rubella booster vaccination on disease activity in patients with juvenile idiopathic arthritis: a randomized trial. *JAMA* 2013; 309 (23): 2449–2456.
18. Chang C.C., Chang Y.S., Chen W.S. et al. Effects of annual influenza vaccination on morbidity and mortality in patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Nationwide Cohort Study. *Sci Rep* 2016; 6: 37817.
19. Kobashigawa T., Nakajima A., Taniguchi A. et al. Vaccination against seasonal influenza is effective in Japanese patients with rheumatoid arthritis enrolled in a large observational cohort. *Scand J Rheumatol* 2013; 42 (6): 445–450.
20. van Assen S., Holvast A., Benne C.A. et al. Humoral responses after influenza vaccination are severely reduced in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Arthritis Rheum* 2010; 62 (1): 75–81.
21. Arad U., Tzadok S., Amir S. et al. The cellular immune response to influenza vaccination is preserved in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab. *Vaccine* 2011; 29 (8): 1643–1648.
22. Richi P., Martín M.D., Navio M.T. et al. Antibody responses to influenza vaccine in patients on biological therapy: Results of RIER cohort study. *Med Clin (Barc)* 2019 Nov 29; 153 (10): 380–386.
23. Lakota K., Perdan-Pirkmajer K., Sodin-Semrl S. et al. The immunogenicity of seasonal and pandemic influenza vaccination in autoimmune inflammatory rheumatic patients—a 6-month follow-up prospective study. *Clin Rheumatol* 2019 May; 38 (5): 1277–1292.
24. Nakafro G., Grainge M.J., Myles P.R. et al. Association between inactivated influenza vaccine and primary care consultations for autoimmune rheumatic disease flares: a self-controlled case series study using data from the Clinical Practice Research Datalink. *Ann Rheum Dis* 2019; 78 (8): 1122–1126.
25. Park J.K., Lee Y.J., Shin K. et al. Impact of temporary methotrexate discontinuation for 2 weeks on immunogenicity of seasonal influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis: a randomised clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2018; 77 (6): 898–904.
26. Gabay C., Bel M., Combescurie C. et al. Impact of synthetic and biologic disease modifying antirheumatic drugs on antibody responses to the AS03-adjuvanted pandemic influenza vaccine: a prospective, open-label, parallel-cohort, single-center study. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1486–1496.
27. Milanetti F., Germano V., Nisini R. et al. Safety and immunogenicity of co-administered MF59-adjuvanted 2009 pandemic and plain 2009–10 seasonal influenza vaccines in rheumatoid arthritis patients on biologicals. *Clin Exp Immunol* 2014; 177 (1): 287–294.
28. Adler S., Krivine A., Weix J. et al. Protective effect of A/H1N1 vaccination in immunemediated disease a prospectively controlled vaccination study. *Rheumatology* 2012; 51: 695–700.

29. Kapetanovic M.C., Kristensen L.E., Saxne T. et al. Impact of anti-rheumatic treatment on immunogenicity of pandemic H1N1 influenza vaccine in patients with arthritis. *Arthritis Res Ther* 2014; 16 (1): R2.
30. Elkayam O., Amir S., Mendelson E. et al. Efficacy and safety of vaccination against pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus among patients with rheumatic diseases. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011; 63 (7): 1062–1067.
31. Miossi R., Fuller R., Moraes J.C. et al. Immunogenicity of influenza H1N1 vaccination in mixed connective tissue disease: effect of disease and therapy. *Clinics (Sao Paulo)* 2013; 68 (2): 129–134.
32. Borte S., Liebert U.G., Borte M., Sack U. Efficacy of measles, mumps and rubella revaccination in children with juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate and etanercept. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48 (2): 144–148.
33. Curtis J.R., Yang S., Patkar N.M. et al. Risk of hospitalized bacterial infections associated with biologic treatment among US veterans with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014; 66 (7): 990–997.
34. Shea K.M., Edelsberg J., Weycker D. et al. Rates of pneumococcal disease in adults with chronic medical conditions. *Open Forum Infect Dis* 2014; 1 (1): ofu024.
35. Coulson E., Saravanan V., Hamilton J. et al. Pneumococcal antibody levels after pneumovax in patients with rheumatoid arthritis on methotrexate. *Ann Rheum Dis* 2011; 70 (7): 1289–1291.
36. Tsuru T., Terao K., Murakami M. et al. Immune response to influenza vaccine and pneumococcal polysaccharide vaccine under IL-6 signal inhibition therapy with tocilizumab. *Mod Rheumatol* 2014; 24: 511–516.
37. Migita K., Akeda Y., Akazawa M. et al. Pneumococcal polysaccharide vaccination in rheumatoid arthritis patients receiving tacrolimus. *Arthritis Res Ther* 2015; 17: 149.
38. Bingham C.O. 3rd, Rizzo W., Kivitz A. et al. Humoral immune response to vaccines in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: results of a randomised controlled trial (VISARA). *Ann Rheum Dis* 2015; 74 (5): 818–822.
39. Rezende R.P.V., Ribeiro F.M., Albuquerque E.M.N. et al. Immunogenicity of pneumococcal polysaccharide vaccine in adult systemic lupus erythematosus patients undergoing immunosuppressive treatment. *Lupus* 2016; 25: 1254–1259.
40. Белов Б.С. Вакцинация при ревматических заболеваниях: союзник или противник? Научно-практическая ревматология. — 2018. — Т. 56. — № 4. — С. 401–404. / Belov B.S. Vaccination in rheumatic diseases: an ally or an enemy? *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2018; 56 (4): 401–404 [In Russian].
41. Tarasova G., Belov B., Bukhanova D. et al. Use of 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine in patients with systemic lupus erythematosus: the relationship of immunogenicity with therapy. *Ann Rheum Dis* 2019; 78 (Suppl 2): 785–786.
42. Bukhanova D., Belov B., Tarasova G. et al. Immunogenicity and safety of 23-valent pneumococcal vaccine in patients with rheumatoid arthritis: results from 5-year follow up. *Ann Rheum Dis* 2019; 78 (Suppl 2): 336.
43. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine for adults with immunocompromising conditions: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2012; 61: 816–819.
44. Чучалин А.Г., Брико Н.И., Авдеев С.Н. и др. Федеральные клинические рекомендации по вакцинопрофилактике пневмококковой инфекции у взрослых. Пульмонология. — 2019. — Т. 29. — № 1. — С. 19–34 / Chuchalin A.G., Briko N.I., Avdeev S.N. et al. Federal clinical guidelines on preventive vaccination against pneumococcal infections in adults. *Russian Pulmonology* 2019; 29 (1): 19–34 [in Russian].
45. Белов Б.С., Буханова Д.В., Тарасова Г.М. Вакцинация в ревматологии: настоящее и будущее. Антибиотики и химиотер. — 2018. — Т. 63. — № 1–2. — С. 56–64. / Belov B.S., Bukhanova D.V., Tarasova G.M. Vaccination in rheumatology: present and future. *Antibiotiki i khimioter* 2018; 63 (1–2): 56–64 [in Russian].
46. Elkayam O., Ablin J., Caspi D. Safety and efficacy of vaccination against streptococcus pneumonia in patients with rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2007 Apr; 6 (5): 312–314.
47. Bukhanova D., Belov B., Tarasova G. et al. Immunogenicity and safety of 23-valent pneumococcal vaccine in patients with rheumatoid arthritis: results from 5-year follow up. *Ann Rheum Dis* 2019; 78 (6): Suppl 2: A336.
48. Devey M. E., Bleasdale K., Isenberg D. A. Antibody affinity and IgG subclass of responses to tetanus toxoid in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1987; 68 (3): 562–569.
49. Battafarano D.F., Battafarano N.J., Larsen L. et al. Antigen-specific antibody responses in lupus patients following immunization. *Arthritis Rheum*. 1998; 41 (10): 1828–1834.
50. Askling H.H., Rombo L., van Vollenhoven R. et al. Hepatitis A vaccine for immunosuppressed patients with rheumatoid arthritis: a prospective, openlabel, multi-centre study. *Travel Med Infect Dis* 2014; 12: 134–142.
51. van den Bijllaardt W., Siers H.M., Timmerman-Kok C. et al. Seroprotection after hepatitis A vaccination in patients with Drug-Induced immunosuppression. *J Travel Med* 2013; 20: 278–282.
52. Zhang J., Xie F., Delzell E. et al. Association between vaccination for herpes zoster and risk of herpes zoster infection among older patients with selected immune-mediated diseases. *JAMA* 2012; 308: 43–49.
53. Yun H., Xie F., Baddley J.W. et al. Longterm Effectiveness of Herpes Zoster Vaccine among Patients with Autoimmune and Inflammatory Diseases. *J Rheumatol* 2017; 44 (7): 1083–1087.
54. Mok C.C., Ho L.Y., Fong L.S. et al. Immunogenicity and safety of a quadrivalent human papillomavirus vaccine in patients with systemic lupus erythematosus: a case-control study. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 659–664.
55. Dhar J.P., Essenmacher L., Dhar R. et al. The safety and immunogenicity of quadrivalent HPV (qHPV) vaccine in systemic lupus erythematosus. *Vaccine* 2017; 35: 2642–2646.
56. Mok C.C., Ho L.Y., To C.H. Long-Term immunogenicity of a quadrivalent human papillomavirus vaccine in systemic lupus erythematosus. *Vaccine* 2018; 36: 3301–3307.
57. Grönlund O., Herweijer E., Sundström K., Arnheim-Dahlström L. Incidence of new-onset autoimmune disease in girls and women with pre-existing autoimmune disease after quadrivalent human papillomavirus vaccination: a cohort study. *J Intern Med* 2016; 280 (6): 618–626.
58. Mahadevan U., Wolf D.C., Dubinsky M. et al. Placental transfer of anti-tumor necrosis factor agents in pregnant patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 286–292.
59. Zelinkova Z., de Haar C., de Ridder L. et al. High intra-uterine exposure to infliximab following maternal anti-TNF treatment during pregnancy. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33: 1053–1058.
60. Berthelsen B.G., Fjeldsoe-Nielsen H., Nielsen C.T. et al. Etanercept concentrations in maternal serum, umbilical cord serum, breast milk and child serum during breastfeeding. *Rheumatology* 2010; 49: 2225–2227.
61. Götestam Skorpen C., Hoeltzenbein M., Tincani A., et al. The EULAR points to consider for use of antirheumatic drugs before pregnancy, and during pregnancy and lactation. *Ann Rheum Dis* 2016; 75 (5): 795–810.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Белов Борис Сергеевич — д. м. н., заведующий лабораторией изучения коморбидных инфекций и мониторинга безопасности лекарственной терапии, ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой, Москва

Тарасова Галина Михайловна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории изучения коморбидных инфекций и мониторинга безопасности лекарственной терапии, ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой, Москва

Муравьева Наталья Валерьевна — к. м. н., научный сотрудник лаборатории изучения коморбидных инфекций и мониторинга безопасности лекарственной терапии, ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой, 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. Статьи направляются по адресу: journalgnca@yandex.ru или размещаются ЧЕРЕЗ САЙТ журнала после регистрации в личном кабинете автора. 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 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 100 названий. Объём заказанных статей устанавливается по договоренности.

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

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

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. В рукописи 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 монографии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, год, количество страниц.

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

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

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

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.



Жизнь продолжается!

Цитофлавин®



**ПАРЕНТЕРАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ АКТИВАЦИИ
МЕТАБОЛИЗМА НЕЙРОНОВ ПРИ ИНФАРКТЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

- достоверное уменьшение объема очага ишемии мозга в 1,5 – 1,7 раза ¹
- выраженный регресс неврологического дефицита к 21-му дню лечения ²
- сравнительно высокие показатели функциональной независимости ³
- улучшение функциональной активности в сочетании с тромболизисом ⁴

¹ С.А. Румянцева с соавторами // Журнал Неврологии и Психиатрии, 8, 2015;

² И.И. Кухтевич с соавторами // Журнал Неврологии и Психиатрии, 12/2, 2014;

³ И.Э. Сазонов с соавторами // Журнал Неврологии и Психиатрии, 2, 2017;

⁴ И.Э. Сазонов с соавторами // Журнал Неврологии и Психиатрии, 3, 2016.