

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 65



7-8'2020

Научно-практический журнал

ФОРЦИС

ЕДИНСТВЕННЫЙ ПРОДУКТ
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
СОДЕРЖАЩИЙ ЭКСТРАКТ
ЛАДАННИКА ШАЛФЕЕЛИСТНОГО
(CISTUS SALVIIFOLIUS)

VIRUSUSTOP.RU



УНИКАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ
ДЕЙСТВИЯ, ОРИГИНАЛЬНЫЙ
СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ



НАТУРАЛЬНЫЙ СОСТАВ
И БЕЗОПАСНОСТЬ

Свидетельство государственной регистрации № RU 77.99.11.003.E.008780.09.15 от 03.09.2015
Имеются противопоказания. Перед применением рекомендуется проконсультироваться с врачом

БАД. НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ

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.
ГНИЦА
Тел.: 8-925-472-30-38
E-mail: journalgnca@yandex.ru
Зав. редакцией Л. Б. Смирнова
Корректор: Е. А. Крыкова
Сайт: www.antibiotics-chemotherapy.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 8-925-472-30-38
E-mail: gncajournal@yandex.ru
Л. И. Гусак

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка через объединённый
каталог «Пресса России»
или через «Агентство «Книга-Сервис»:
подписной индекс — Е71404

Журнал зарегистрирован
в Комитете РФ по печати
Рег. свид. № 0110694 от 25 мая 1993 г.
Установочный тираж 5000 экз.

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: 2020

Свободная цена

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 65

7—8'2020

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

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.	Тец В. В.
Захарова Ю. А.	Ших Е. В.
Зуева Л. 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

Долгих В. Т., Пьянова Л. Г., Наумкина Е. В.,
Лавренев А. В., Матущенко Е. В., Корниенко Н. В.
Антибактериальная активность модифицированных
углеродных сорбентов, перспективных
для аппликационного применения
Есаулкова Я. Л., Мурyleва А. А., Синегубова Е. О.,
Беляевская С. В., Гаршинина А. В., Киреева М. А.,
Волобуева А. С., Слита А. В., Кадырова Р. А., Зарубаев В. В.
Механизмы противовирусной активности экстракта
ладанника шалфеистого (*Cistus salviifolius*)
в отношении респираторных вирусов человека
Хобракова В. Б., Разуваева Я. Г., Будаева Е. Р.
Коррекция экстрактом *Gentiana algida* Pall
структурных изменений в тимусе при экспериментальной
азатиоприновой иммуносупрессии

В помощь практикующему врачу

Суадкиа С., Подопригора И. В.,
Яшина Н. В., Саруханова Л. Е., Кравцов Э. Г.
Антибиотикорезистентные уропатогенные *Escherichia coli*,
выделенные от детей с врождёнными аномалиями
развития мочевыделительной системы
Сабитов А. У., Белоусов В. В., Един А. С.,
Олейниченко Е. В., Гладунова Е. П., Тихонова Е. П.,
Кузьмина Т. Ю., Калинина Ю. С., Сорокин П. В.
Практический опыт применения препарата Риамиловир
в лечении пациентов с COVID-19 средней степени тяжести
Краснова Н. М., Евдокимова Н. Е., Егорова А. А.,
Филиппова О. И., Алексеева Е. А., Рудых З. А.,
Чертовских Я. В., Венгеровский А. И.,
Кравченко А. Ф., Сычев Д. А.
Влияние типа ацетилирования
на частоту гепатотоксичности изониазида у пациентов
с впервые выявленным туберкулёзом органов дыхания

Стандартизация и контроль безопасности лекарственных средств

Семенова Е. Н., Кулешова С. И., Саканян Е. И.
Разработка турбидиметрической методики
количественного определения антибиотиков группы
аминогликозидов в лекарственных препаратах
для медицинского применения

Обзоры

Беседнова Н. Н., Кузнецова Т. А., Запорожец Т. С.,
Крыжановский С. П., Гусева Л. Г., Звягинцева Т. Н.
Полисахариды морских водорослей — перспективные
средства патогенетической терапии инфекционной диареи
Зырянов С. К., Байбулатова Е. А.
Рифаксимин-альфа и другие кристаллические формы
рифаксимины: есть ли отличия?

Лекции

Белов Б. С., Балабанова Р. М.
Реактивные артриты: современные аспекты
диагностики и лечения

Original Papers

- 3 Dolgikh V. T., Pyanova L. G., Naumkina E. V.,
Lavrenov A. V., Matushchenko E. V., Kornienko N. V.
Antibacterial Activity of Modified
Carbon Sorbents
Prospective for Application
- 8 Esaulkova Ya. L., Muryleva A. A., Sinegubova E. O.,
Belyaevskaya S. V., Garshinina A. V., Kireeva M. A.,
Volobueva A. S., Slita A. V., Kadyrova R. A., Zarubaev V. V.
Mechanisms of Antiviral Activity
of *Cistus Salviifolius* Extract Against
Human Respiratory Viruses
- 18 Khobrakova V. B., Razuvaeva Ya. G., Budaeva E. R.
Correction of Structural Changes in Thymus
by *Gentiana algida* Pall Extract at Experimental
Azathioprine Immunosuppression

Guidelines for Practitioners

- 23 Suadkia S., Podoprighora I. V., Yashina N. V.,
Sarukhanova L. E., Kravtsov E. G.
Antibiotic-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli*
Isolated from Children with Congenital Abnormalities
of the Kidneys and Urinary Tract
- 27 Sabitov A. U., Belousov V. V., Edin A. S.,
Oleinichenko E. V., Gladunova E. P., Tikhonova E. P.,
Kuzmina T. Yu., Kalinina Yu. S., Sorokin P. V.
Practical Experience of Using Riamilovir in Treatment
of Patients with Moderate COVID-19
- 31 Krasnova N. M., Evdokimova N. E., Egorova A. A.,
Filippova O. I., Alekseeva E. A., Rudykh Z. A.,
Chertovskiy Ya. V., Vengerovskii A. I.,
Kravchenko A. F., Sychev D. A.
Influence of the Acetylation Type on the Incidence
of Isoniazid-Induced Hepatotoxicity in Patients
with Newly Diagnosed Pulmonary Tuberculosis

Drug Standardization and Control

- 37 Semenova E. N., Kuleshova S. I., Sakanyan E. I.
The Development of a Turbidimetric Method
for the Quantitative Determination
of Antibiotics of the Aminoglycoside Group
in Medications

Reviews

- 42 Besednova N. N., Kuznetsova T. A., Zaporozhets T. S.,
Kryzhanovsky S. P., Guseva L. G., Zvyagintseva T. N.
Marine Algae Polysaccharides — a Promising Means
of Pathogenetic Therapy of Infectious Diarrhea
- 52 Zyryanov S. K., Baybulatova E. A.
Rifaximin-Alpha and Other Crystalline Forms of Rifaximin:
Are There Any Differences?

Lectures

- 63 Belov B. S., Balabanova R. M.
Reactive Arthritis: Modern Aspects
of Diagnosis and Treatment

* 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.

Антибактериальная активность модифицированных углеродных сорбентов, перспективных для аппликационного применения

*В. Т. ДОЛГИХ¹, Л. Г. ПЬЯНОВА², Е. В. НАУМКИНА³, А. В. ЛАВРЕНОВ²,
Е. В. МАТУШЧЕНКО³, Н. В. КОРНИЕНКО²

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР, Москва

² Центр новых химических технологий ФГБУН «Института катализа им. Г. К. Борескова СО РАН», Омск

³ Омский государственный медицинский университет Минздрава России, Омск

Antibacterial Activity of Modified Carbon Sorbents, Prospective for Application

*V. T. DOLGIKH¹, L. G. PYANOVA², E. V. NAUMKINA³, A. V. LAVRENOV², E. V. MATUSHCHENKO³, N. V. KORNIENKO²

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow

² Center of New Chemical Technologies of Boreskov Institute of Catalysis of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Omsk

³ Omsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Omsk

Цель — изучить антибактериальные и антимикотические свойства углеродных сорбентов, модифицированных биологически активными веществами, в отношении возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний. **Материал и методы.** Изучалась активность растворов модификаторов и модифицированных образцов углеродных сорбентов в отношении тест-штаммов условно-патогенных микроорганизмов в сравнении с исходным образцом углеродного сорбента. Из тест-штаммов микроорганизмов готовили взвесь с известным содержанием микробных клеток, инкубировали в лунках с исследуемыми образцами в течение 48 ч. Выживаемость микроорганизмов определяли путём количественных высевов из каждой лунки смеси «образец — микроорганизм» через определённые промежутки времени термостатирования на чашки Петри с простым питательным агаром, затем подсчитывали количество жизнеспособных микробных клеток в исследуемой смеси. **Результаты.** Проведённые исследования продемонстрировали высокую антибактериальную и антимикотическую активность модифицированных углеродных сорбентов. Наилучший результат в сравнении с исходным образцом показал углеродный сорбент, модифицированный олигомерами молочной кислоты с иммобилизованным лизоцимом. Проведённые исследования показали перспективность использования модифицированных образцов углеродного сорбента для аппликационной терапии бактериальных инфекций.

Ключевые слова: углеродные сорбенты, модификаторы, синтез, сорбционная терапия, микробиоценоз, тест-штаммы микроорганизмов.

The aim of the work is to study the antibacterial and antimycotic properties of carbon sorbents modified with biologically active substances in relation to pathogens of purulent-inflammatory diseases. *Material and methods.* The activity of modifier solutions and modified samples of carbon sorbents was studied in relation to test strains of opportunistic microorganisms in comparison with the initial sample of carbon sorbent. A suspension with a known content of microbial cells was prepared from test strains of microorganisms; it was incubated in wells with test samples for 48 hours. The survival of microorganisms was determined by quantitative inoculation from each well of the sample and microorganism mixture at regular intervals of incubation on Petri dishes with simple agar nutrient, then the number of viable microbial cells in the test mixture was counted. *Results.* Studies have shown high antibacterial and antimycotic activity of modified carbon sorbents. The best result in comparison with the initial sample was demonstrated by a carbon sorbent modified with lactic acid oligomers and immobilized lysozyme. Studies have shown the promise of using modified carbon sorbent samples for the application therapy in bacterial infections.

Keywords: carbon sorbents, modifiers, synthesis, sorption therapy, microbiocenosis, test strains of microorganisms.

Введение

В последнее десятилетие в медицине критических состояний исследуется эффективность использования сорбционной терапии — детоксикация организма с помощью перфузии биологической жидкости (крови, лимфы) через колонку с

сорбентом, либо энтерального или аппликационного применения углеродных сорбентов [1]. Гемосорбенты, энтеросорбенты и вальверсорбенты предназначены для удаления из организма эндогенных и экзогенных токсичных продуктов с одновременным повышением чувствительности организма к базисной фармакотерапии.

Основными методами лечения больных с гнойно-воспалительными заболеваниями различной локализации является этиотропная и патоген-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: E-mail: prof_dolgi@mail.ru

нетическая терапия. Вместе с тем, антибактериальные препараты оказывают эффект по истечении длительного времени, негативно влияют на микробиоценоз, увеличивают число антибиотикорезистентных микроорганизмов и оказывают побочное действие на организм. В этой связи для лечения больных с раневой инфекцией и тяжёлыми гнойно-септическими заболеваниями бактериальной природы необходимы новые подходы и препараты, отличающиеся по механизму действия от антибиотиков и обладающие высокой антимикробной и антимикотической активностью.

По нашему мнению, одним из приоритетных направлений сорбционной терапии является аппликационная сорбция — вульнеросорбция [2–4], сущность которой заключается в извлечении токсичных веществ, продуктов клеточной дегенерации, микробных клеток, бактериальных токсинов из ран при контакте сорбционного материала с раневой поверхностью. Сорбция раневого содержимого позволяет в короткие сроки уменьшить травматический или воспалительный отёк мягких тканей, улучшить микроциркуляцию в тканях, снизить количество микроорганизмов в ране в среднем в 100–1000 раз по сравнению с традиционными асептическими перевязочными материалами. Вульнеросорбция позволяет существенно улучшить исходы лечения травматических, гнойных и ожоговых ран, трофических язв и др. Широко используется внутриполостная сорбция при гнойно-воспалительных процессах: перитоните, абсцессах лёгких и печени [5, 6].

Углеродные сорбенты проявляют довольно высокую активность в отношении бактерий и их токсических продуктов, но нередко активны в отношении узкого спектра возбудителей. Повышение биоспецифических свойств возможно за счёт нанесения на поверхность сорбентов модификаторов — препаратов, проявляющих активность в отношении широкого спектра возбудителей, но не оказывающих отрицательного воздействия на организм. В качестве модификаторов применяются биологически активные вещества различной природы, обладающие антибактериальными и антимикотическими свойствами. Действие модифицированных сорбентов основано на совмещении адсорбционных свойств нанопористой углеродной матрицы и антибактериальных, антимикотических свойств модификаторов.

В Центре новых химических технологий ФГБУН «Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН» создан гранулированный сорбент на основе нанодисперсного углерода, обладающий высокой совместимостью с биологическими жидкостями и мезопористой структурой [7]. В Институте в течение последних лет ведутся исследования по созданию модифицированных углеродных сорбентов биологически активными

веществами (поливинилпирролидон, бетулин, молочная кислота, лизоцим и т. д.), обладающими антибактериальными и антимикотическими свойствами.

Цель исследования — изучить антибактериальные и антимикотические свойства углеродных сорбентов, модифицированных биологически активными веществами, в отношении возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний.

Материал и методы

Углеродный сорбент и его модифицированные образцы получены в Центре новых химических технологий Института катализа им. Г. К. Борескова СО РАН. В качестве модификаторов применяли поливинилпирролидон («Sigma-Aldrich», Германия), бетулин (ФГБУН Институт химии и химической технологии СО РАН, Красноярск), молочная кислота («Мосреактив», Россия), лизоцим (Sigma-Aldrich, Германия). Методика модифицирования углеродного сорбента (УМ) олигомерами молочной кислоты с иммобилизованным лизоцимом МК-Л-УМ включает пропитку сорбента раствором молочной кислоты с последующей термообработкой, активацию поверхностных функциональных (карбоксильных) групп и иммобилизацию лизоцима на поверхности сорбента [8]. Модифицирование углеродного сорбента поли-N-винилпирролидоном совместно с бетулином (Б-ПВП-УМ) проводили путём пропитки углеродного материала раствором бетулина в N-винилпирролидоне с последующей полимеризацией (инициатор полимеризации — динитрил азобисизомасляной кислоты, ДИНИЗ) и термообработкой модифицированного сорбента в инертной среде [9].

В исследование включено 7 образцов сорбентов: образец № 1 — исходный гранулированный немодифицированный углеродный сорбент ВНИИТУ-1 (УМ); образец № 2 — сорбент, модифицированный 80% раствором молочной кислоты (МК); образец № 3 — сорбент, модифицированный бетулином (Б); образец № 4 — сорбент, модифицированный поливинил-N-пирролидоном (ПВП); образец № 5 — сорбент, модифицированный раствором лизоцима в ацетатном буфере; образец № 6 — гранулированный сорбент, модифицированный поли-N-винилпирролидоном с последующим нанесением бетулина (Б-ПВП-УМ); образец № 7 — сорбент, модифицированный молочной кислотой и лизоцимом (МК-Л-УМ).

В качестве тест-культур использовались следующие штаммы: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* 418, *Escherichia coli* ATCC 25922 и ассоциация микроорганизмов — *Candida albicans* (клинический штамм) + *Escherichia coli* ATCC 25922. Выбор видов микроорганизмов обусловлен их наибольшей клинической значимостью в этиологии гнойно-воспалительных процессов, в том числе женской половой системы в соответствии с возможной сферой применения данных образцов. Состав тестируемой бактериально-грибковой ассоциации объясняется частой встречаемостью при рецидивирующем урогенитальном кандидозе.

Испытуемые образцы №№ 1–7 предварительно стерилизовали при 121°C в течение 20 мин. Для тестирования использовали суточные культуры, выращенные на простом питательном агаре. Эталонные штаммы были проверены на чистоту и отсутствие диссоциаций; клинический штамм *C. albicans*, выделенный из биоматериала от пациентки с урогенитальным кандидозом, верифицирован методом Maldi-ToF масс-спектрометрии (Vitesc-MS). Суточную агаровую культуру исследуемых штаммов смывали стерильным физиологическим раствором, из полученной суспензии готовили взвеси микроорганизмов в концентрации 500 млн микробных тел в 1 мл раствора (0,5 ME по Mc Farland). Затем путём десятикратных разведений взвеси доводили до рабочей концентрации 10⁶/мл микроб-

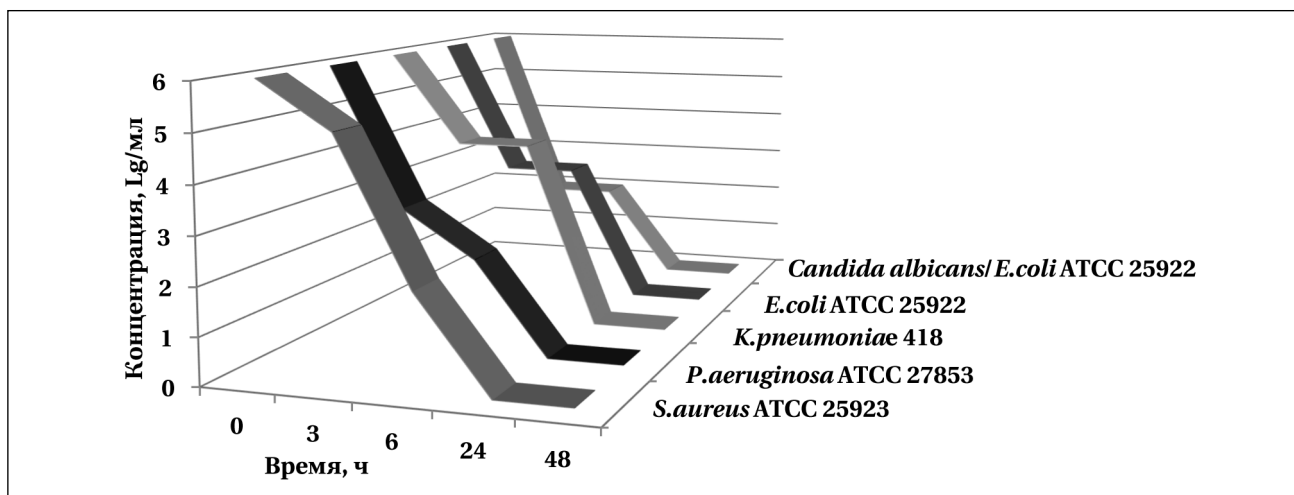


Рис. 1. Динамика снижения численности тест-микроорганизмов при испытании исходного образца.

ных тел. В лунки стерильного планшета помещали исследуемый образец, затем добавляли рабочую взвесь тест-культуры в количестве 2,0 мл до полного смачивания, ориентировочно 1:1. Смесь «образец — микроорганизм» тщательно перемешивали и инкубировали в термостате при температуре 37°C.

Выживаемость микроорганизмов определяли путём количественных высевов из каждой лунки смеси «образец — микроорганизм» через определённые промежутки времени термостатирования на чашки Петри с простым питательным агаром методом секторных посевов (Голда). На каждое сочетание «образец — микроорганизм» делали по три повторения параллельных высевов. Видовую принадлежность культур подтверждали результатами изучения культуральных, морфологических и биохимических свойств.

Первый высев (контроль) делали сразу после добавления образца в взвесь микроорганизмов без термостатирования, далее через 3 — 6 — 24 — 48 ч инкубации. После инкубации чашек с простым питательным агаром при 37°C в течение 24 ч регистрировали наличие или отсутствие роста и количество микробных клеток в 1 мл смеси.

Результаты исследования

В качестве контроля на первом этапе было проведено изучение антибактериальной активности исходного образца углеродного сорбента ВНИИТУ-1.

Динамика снижения концентрации используемых тест-штаммов микроорганизмов при инкубации с исходным немодифицированным сорбентом представлена на рис. 1. При исходной концентрации 10^6 КОЕ/мл уже через 3 ч инкубации отмечалось снижение микробной нагрузки различной степени по видам микроорганизмов, которое продолжалось в течение 6 ч, и затем при высевах через 24 ч во всех случаях отмечалось полное отсутствие роста микроорганизмов. При этом следует отметить более медленное снижение концентрации представителей *Enterobacteriales* в сравнении с другими тест-штаммами.

Далее было проведено изучение используемых растворов модификаторов в отношении той же линейки возбудителей в аналогичном опыте. Наибольшую активность проявил исследуемый

раствор молочной кислоты (образец № 2 — МК). Отмечалось полное отсутствие роста всех изученных тест-штаммов при высевах уже через 3 ч инкубации. Результаты исследования действия образцов № 3 и № 4 (бетулин и поли-N-винилпирролидон) представлены в таблице. Видно, как постепенно снижались концентрации *S.aureus* ATCC 25923, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *K.pneumoniae* 418 при инкубации с обоими образцами через 3 и 6 ч инкубации с полным исчезновением к 24 ч, что сопоставимо с активностью исходного образца немодифицированного углеродного сорбента. Вместе с тем, в смеси *E.coli* ATCC 25922 изолированно, а также в смеси *E.coli* + *C.albicans* микроорганизмы сохраняли жизнеспособность после инкубации с образцом № 4 через 24 ч инкубации, хотя и в минимальной концентрации, исчезая лишь через 48 ч. Образец № 3 существенно хуже действует на дрожжеподобные грибы рода *C.albicans* — отмечается сохранение жизнеспособных микроорганизмов даже через 48 ч.

Образец модификатора № 5 (раствор лизоцима в ацетатном буфере) показал ожидаемо высокую активность в отношении *S.aureus* ATCC 25923 — отсутствие роста наблюдалось уже через 6 ч инкубации. Также отмечалось отсутствие роста обоих микроорганизмов смеси *E.coli* + *C.albicans* через 3 ч. Остальные тест-штаммы подавлялись в течение 24 ч инкубации.

Результаты изучения модифицированных образцов сорбентов выявили следующее. Наиболее высокая антибактериальная/антимикотическая активность выявлена у образца № 7 — МК-Л-УМ: ни один из изученных штаммов микроорганизмов не был выявлен при высевах из смеси уже через 3 ч инкубации с образцом. Активность образца № 6 — Б-ПВП-УМ практически аналогична результатам испытания модификатора ПВП изолированно (см. таблицу) — отсутствие роста

Динамика изменения концентрации тест-штаммов микроорганизмов при инкубации с растворами модификаторов образцов № 3Б и № 4 ПВП

Тест-культуры	0 ч		3 ч		6 ч		24 ч		48 ч	
	№3Б	№4ПВП	№3Б	№4ПВП	№3Б	№4ПВП	№3Б	№4ПВП	№3Б	№4ПВП
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ³	10 ²	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
<i>K.pneumoniae</i> 418	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
<i>E.coli</i> ATCC 25922	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ³	10 ⁴	Роста нет	10 ²	Роста нет	Роста нет
Смесь <i>C.albicans</i> / <i>E.coli</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵ /10 ⁵	10 ⁵ /10 ⁵	10 ³ /10 ²	10 ² /10 ³	10 ² /роста нет	10 ² /10 ²	10 ² /роста нет	Роста нет/роста нет

большинства тест-штаммов через 24 ч инкубации, *E.coli* изолированно и смеси *E.coli* + *C.albicans* — через 48 ч.

Наибольшая вариабельность при испытании модифицированных образцов выявлена в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*, что демонстрирует рис. 2. Наибольшая антимикотическая активность выявлена у образца МК-Л-УМ — полное подавление роста через 3 ч; далее следует МК-УМ (6 ч). Образец Б-ПВП-УМ приводил к снижению концентрации *C.albicans* существенно медленнее, тем не менее через 48 ч рост уже не регистрировался.

Заключение

Таким образом, проведённые исследования выявили высокую антибактериальную и антимикотическую активность углеродных сорбентов, модифицированных комплексами биологически активных веществ образцов, по отношению к наиболее распространённым условно-патогенным возбудителям гнойно-воспалительных заболеваний бактериальной и грибковой природы в сравнении с исходным немодифицированным образцом сорбента. Наибольшую антибактериальную и антимикотическую активностью проявил углеродный сорбент, модифицированный олигомерами молочной кислоты с иммобилизованным лизоцимом. Механизм биоспецифической активности в данном случае, вероятно, связан с комбинацией сорбционного действия исходного сорбента и создания кислой среды молочной кислотой, неблагоприятной для большинства тестируе-

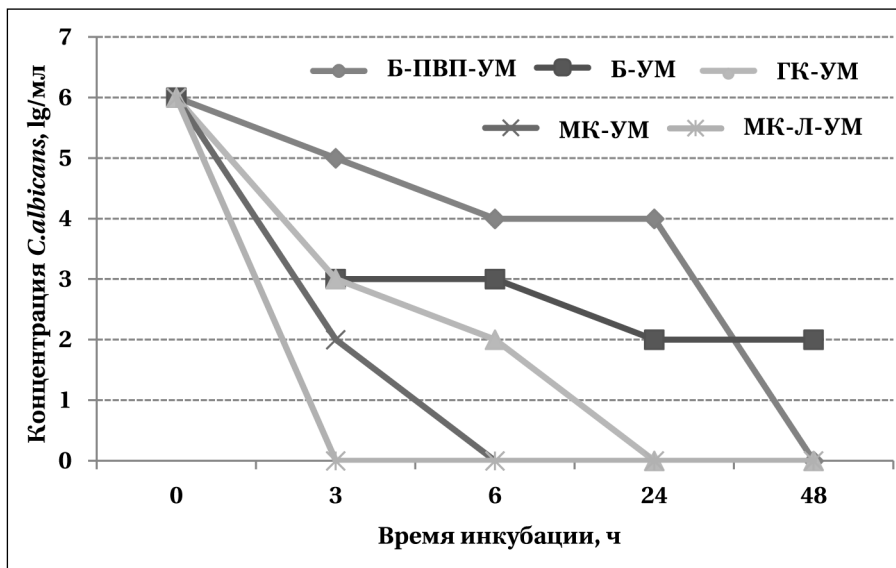


Рис. 2. Антимикотическая активность модифицированных образцов сорбентов в отношении *Candida albicans*.

мых возбудителей, в комплексе со специфической антимикробной активностью лизоцима.

Применение углеродных сорбентов, модифицированных олигомерами молочной кислоты с иммобилизованным лизоцимом и поливинилпирролидоном совместно с бетулином, представляется наиболее перспективным для аппликационной терапии гнойно-воспалительных инфекций женской половой сферы ввиду высокой эффективности *in vitro* в стендовых испытаниях, а также физиологичного для вагинального биотопа механизма действия, сходного с механизмами защитного действия нормальной микрофлоры и местных факторов естественной неспецифической защиты.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института катализа СО РАН (проект АААА-А19-119050790074-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Долгих В.Т., Пьянова Л.Г., Лихолобов В.А., Долгих Т.И., Таран Н.И., Хвостунцев С.М. Использование углеродных сорбентов при критических состояниях организма. Омский научный вестник. — 2015. — № 2. — С. 19–22. / Dolgikh V.T., Pyanova L.G., Likholobov V.A., Dolgikh T.I., Taran N.I., Khvostuntsev S.M. Use of carbon sorbents in critical states of organism. Omsky Nauchniy Vestnik 2015; 2: 19–22 [in Russian]
- Ославский А.И. Сорбционные средства и методы в комплексном лечении гнойных ран (обзор литературы). Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2016. — № 3. — С. 30–33. / Oslavsky A.I. Sorption Agents and Methods in Complex Treatment of Purulent Wounds (Literature Review). Zhurnal Grodnenskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta 2016; 3: 30–33. [in Russian]

3. *Баринов С.В., Долгих В.Т., Долгих Т.И., Баракина О.В., Пьянова Л.Г.* Разработка и применение формованных углеродных сорбентов при лечении хронического эндометрита. Сибирский медицинский журнал (Иркутск). — 2014. — № 4. — С. 55–59. / *Barinov S.V., Dolgikh V.T., Dolgikh T.I., Barakina O.V., Pyanova L.G.* Development and application of molded carbon sorbents in the treatment of chronic endometritis. *Sibirsky Meditsinsky Zhurnal (Irkutsk)* 2014; 4: 55–59. [in Russian]
4. *Levashov P.A., Afanasieva O.I., Dmitrieva O.A. et al.* Preparation of affinity sorbents with immobilized synthetic ligands for therapeutic apheresis. *Biochemistry* 2010; 4: 3: 303–307.
5. *Дибиров М.Д., Костюченко М.В., Елинсон В.М., Лямин А.Н.* Энтеросорбционная и экстракорпоральная коррекция гомеостатических нарушений в лечении острой абдоминальной хирургической патологии, осложнённой эндотоксикозом. Фундаментальные исследования. — 2012. — № 1 — С. 39–42. / *Dibirov M.D., Kostyuchenko M.V., Elinson V.M., Lyamin A.N.* Enterosorbational and extracorporeal correction of homeostatic disorders in the treatment of acute abdominal surgical pathology complicated by endotoxemia. *Fundamentalnye Issledovaniya* 2012; 1: 39–42. [in Russian]
6. *Долгих В.Т., Долгих Т.И., Пьянова Л.Г., Лихолобов В.А., Баринов С.В., Баракина О.В., Гриценко Н.С., Толкач А.Б.* Антимикробная активность гранулированных углеродных сорбентов. Российский иммунологический журнал. — 2014. — Т. 8. — № 3. — С. 788–791. / *Dolgikh V.T., Dolgikh T.I., Pyanova L.G., Likholobov V.A., Barinov S.V., Barakina O.V., Gritzenko N.S., Tolchach A.B.* Antimicrobial activity of granular carbon sorbents. *Russkiy Immunologicheskiy Zhurnal* 2014; 8: 788–791. [in Russian]
7. *Пьянова Л.Г., Бакланова О.Н., Лихолобов В.А.* Исследование эффекта модифицирования поверхности углеродных сорбентов поли-N-винилпирролидоном комплексом физико-химических и микробиологических методов. Физикохимия поверхности и защита материалов. — 2013. — Т. 49, № 4. — С. 408–417. / *Pyanova L.G., Baklanova O.N., Likholobov V.A. et al.* Investigation of the effect of surface modification of carbon sorbents with poly-N-vinylpyrrolidone by a complex of physicochemical and microbiological methods. *Physikokhimiya Poverkhnosti i Zashchita Materialov* 2013; 49: 4: 408–417. [in Russian]
8. *Пьянова Л.Г., Лихолобов В.А., Дроздов В.А. и др.* Синтез и физико-химические свойства биоспецифического углеродного сорбента, модифицированного олигомерами молочной кислоты. Физикохимия поверхности и защита материалов. — 2017. — Т. 53. — № 4. — С. 368–374. / *Pyanova L.G., Likholobov V.A., Drozdov V.A. et al.* Synthesis and physicochemical properties of a biospecific carbon sorbent modified with lactic-acid oligomers. *Physikokhimiya Poverkhnosti i Zashchita Materialov* 2017; 53: 4: 369–374. [in Russian]
9. *Пьянова Л.Г., Дроздов В.А., Седанова А.В. и др.* Синтез модифицированных углеродных сорбентов и исследование их антиоксидантных свойств. Физикохимия поверхности и защита материалов. — 2018. — Т. 54. — № 6. — С. 544–548. / *Pyanova L.G., Drozdov V.A., Sedanova A.V. et al.* Synthesis of Modified Carbon Sorbents and a Study of Their Antioxidant Properties. *Physikokhimiya Poverkhnosti i Zashchita Materialov* 2018; 54: 6: 544–548. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Долгих Владимир Терентьевич — д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва

Пьянова Лидия Георгиевна — д. б. н., заведующая лабораторией синтеза функциональных углеродных материалов ЦНХТ ИК СО РАН, Омск. Author ID: 417502

Наумкина Елена Витальевна — д. м. н., заведующая бактериологической лабораторией, Городской клинический перинатальный центр, Омск; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Омский государственный медицинский университет, Омск. Author ID: 753166

Лавренов Александр Валентинович — д. х. н., директор ЦНХТ ИК СО РАН, Омск. Author ID: 363779

Матущенко Елена Валериевна — к. м. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Омский государственный медицинский университет, Омск. Author ID: 654129

Корниенко Наталья Викторовна — младший научный сотрудник лаборатории синтеза функциональных углеродных материалов ЦНХТ ИК СО РАН, Омск. Author ID: 741459

Механизмы противовирусной активности экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) в отношении респираторных вирусов человека

Я. Л. ЕСАУЛКОВА¹, А. А. МУРЫЛЕВА¹, Е. О. СИНЕГУБОВА¹, С. В. БЕЛЯЕВСКАЯ¹, А. В. ГАРШИННИНА¹,
М. А. КИРЕЕВА², А. С. ВОЛОБУЕВА¹, А. В. СЛИТА¹, Р. А. КАДЫРОВА¹, *В. В. ЗАРУБАЕВ¹

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург

Mechanisms of Antiviral Activity of *Cistus Salviifolius* Extract Against Human Respiratory Viruses

YA. L. ESAULKOVA¹, A. A. MURYLEVA¹, E. O. SINEGUBOVA¹, S. V. BELYAEVSKAYA¹, A. V. GARSHININA¹,
M. A. KIREEVA², A. S. VOLOBUEVA¹, A. V. SLITA¹, R. A. KADYROVA¹, *V. V. ZARUBAEV¹

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg

² St. Petersburg University, St. Petersburg

Грипп и ОРВИ являются наиболее распространёнными формами инфекционных респираторных заболеваний человека. В этой связи разработка и внедрение средств профилактики и лечения вирусных инфекций представляет актуальнейшую задачу. Целью настоящего исследования явилось изучение механизмов противовирусной активности экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) в отношении возбудителей гриппа и ОРВИ у человека. В ходе работы было показано, что экстракт ладанника ингибирует репродукцию вирусов гриппа А(H1N1), А(H1N1)pdm09, А(H3N2), А(H5N2), А(H7N9) и вируса гриппа В. Максимальную вирусингибирующую активность экстракт проявлял на ранних стадиях вирусного цикла (0–2 ч после инфицирования). Экстракт ладанника существенно снижал гемагглютинирующую активность вируса, и при этом не влиял на фузогенные свойства вирусного гемагглютинина. При помощи электронной микроскопии показано, что экстракт ладанника препятствует сорбции вирионов гриппа на поверхности клеток в культуре. Показана также ингибирующая активность экстракта в отношении других респираторных вирусов человека — вируса парагриппа и аденовируса. В опытах на модели гриппозной пневмонии у мышей показана протективная активность экстракта ладанника при интраназальном применении. Степень этой активности ослабевала с увеличением времени между применением экстракта и инфицированием животных. Вирус, предварительно инкубированный с экстрактом ладанника, вообще не вызывал гибели животных. Полученные данные свидетельствуют, что экстракт ладанника шалфеелистного является эффективным средством профилактики респираторных вирусных инфекций человека широкого спектра действия.

Ключевые слова: инфекционные респираторные заболевания, экстракт ладанника, пневмония, противовирусная активность, мыши.

Influenza and ARVIs are the most common forms of infectious respiratory diseases in humans. In this regard, the search and development of means for the prevention and treatment of viral infections is a high priority task. The aim of this study was to assess the mechanisms of the antiviral activity of sage-leaved rock-rose extract (*Cistus salviifolius*) against the causative agents of influenza and ARVIs in humans. In the course of the study, it was shown that *C. salviifolius* extract inhibits reproduction of influenza viruses A(H1N1), A(H1N1)pdm09, A(H3N2), A(H5N2), A(H7N9) and influenza B virus. The extract showed maximum virus-inhibiting activity at the early stages of the viral cycle (0–2 hours after infection). *C. salviifolius* extract significantly reduced the hemagglutinating activity of the virus, and at the same time did not affect the fusogenic properties of viral hemagglutinin. Transmission electron microscopy was used to demonstrate that the cistus extract prevents the absorption of influenza virions on the surface of cells in culture. The inhibitory activity of the extract against other human respiratory viruses, parainfluenza virus and adenovirus, was also shown. The protective activity of *C. salviifolius* extract was demonstrated when applied intranasally during the experiments on a model of influenza pneumonia in mice. The degree of this activity was in inverse proportion to the time window between the application of the extract and the infection of the animals. The virus, pre-incubated with *C. salviifolius* extract, did not cause death in the animals. The data obtained indicate that *C. salviifolius* extract serves as an effective and broad-range means of preventing respiratory viral infections in humans.

Keywords: infectious respiratory diseases, cistus extract, pneumonia, antiviral activity, mice.

Введение

Грипп и ОРВИ являются наиболее распространёнными формами инфекционных респираторных заболеваний человека. Эти патологии вызывают около 90% всей инфекционной заболеваемости населения. В России регистрируется от 27 до 41 млн случаев этих заболеваний в год. В эту группу патогенов, помимо гриппа, входят также вирусы других семейств: корона-, адено-, пикорна- и парамиксовирусы, а также метапневмо- и

торных заболеваний человека. Эти патологии вызывают около 90% всей инфекционной заболеваемости населения. В России регистрируется от 27 до 41 млн случаев этих заболеваний в год. В эту группу патогенов, помимо гриппа, входят также вирусы других семейств: корона-, адено-, пикорна- и парамиксовирусы, а также метапневмо- и

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

бокавирусы, чья роль в развитии поражений респираторного тракта определена недавно [1].

Наиболее опасную вирусную инфекцию представляет грипп. Благодаря особенностям генома, вирусы гриппа являются высокоизменчивыми организмами. Это обуславливает ускользание от иммунного ответа организма, в том числе стимулированного вакцинами, а также способность к формированию штаммов, устойчивых к действию противовирусных препаратов [2]. Благодаря антигенному дрейфу и реассортации фрагментов генома вирус гриппа вызывает ежегодные эпидемии и пандемии, последняя из которых произошла в 2009 г. («свиной» грипп) [3].

Разработка и внедрение средств профилактики и лечения вирусных инфекций представляет актуальнейшую задачу для медицинской науки и практического здравоохранения. На сегодняшний день на фармацевтическом рынке представлены специфические противовирусные препараты против гриппа — ингибиторы ионного канала М2 ремантадин и амантадин, ингибиторы нейраминидазы осельтамивир, занамивир, перамивир и ланинамивир, ингибитор вирусного гемагглютинина умифеновир (Арбидол), а также блокатор вирусного полимеразного комплекса балокасава марбоксил (Ксофлюза). Тем не менее, до настоящего времени не создано средств достаточно широкого спектра действия, способных кардинально предотвратить распространение ОРВИ. В этой связи на первый план выходят методы неспецифической профилактики и терапии этих заболеваний.

Ранее была показана противогриппозная активность экстракта ладанника (*Cistus incanus*) [4–6]. Нами были также показаны противогриппозные свойства экстракта близкородственного растения, ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) [7]. Целью настоящего исследования явилось изучение механизмов противовирусной активности экстракта ладанника шалфеелистного в отношении возбудителей гриппа и ОРВИ у человека. В задачи работы входило исследование вирусингибирующей активности экстракта ладанника в отношении вирусов парагриппа и аденовируса человека, изучение механизмов противовирусной активности экстракта ладанника в отношении вируса гриппа, а также оценка протективной активности экстракта ладанника шалфеелистного при местном применении на модели гриппозной пневмонии у животных.

Материал и методы

1. Исследуемые препараты. В работе использовали экстракт ладанника шалфеелистного производства ООО «Торговый дом «Фармпроект»» в виде бурого водорастворимого порошка.

2. Вирусы и клетки. В исследовании использовали следующие вирусы из коллекции вирусных штаммов НИИЭМ им. Пастера:

- вирус парагриппа человека 3 типа;

- аденовирус человека 5 типа;
- вирус гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2);
- вирус гриппа A/mallard/Pennsylvania/1984 (H5N2);
- вирус гриппа B/Florida/04/06 (Yamagata-like);
- вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1);
- вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09;
- вирус гриппа A/Anhui/1/13 (H7N9);

Вирусы накапливали в клетках перmissive линий: вирусы гриппа — в клетках MDCK, аденовирус — в клетках Vero, вирус парагриппа — в клетках MA-104.

3. Изучение противовирусного действия экстракта ладанника в отношении респираторных вирусов человека. Клетки перmissive линий сеяли на 24-луночные планшеты и инкубировали в течение 16–24 ч до формирования монослоя. Экстракт ладанника вносили в диапазоне концентраций в лунки планшетов с монослоем клеток в объёме 0,5 мл. Планшеты с клетками инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 1 ч. После этого в лунки вносили по 0,5 мл соответствующего вируса (m.o.i. 0,01) в среде альфа-МЕМ и инкубировали в течение 1 ч. После этого жидкость из лунок отбирали, клетки промывали и вносили в лунки по 1 мл свежей среды с экстрактом ладанника в соответствующих концентрациях. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 48–72 ч в зависимости от вируса. Далее в культуральной жидкости определяли инфекционный титр вируса, как описано ниже.

4. Титрование вирусов. Из вирусосодержащего материала готовили серию десятикратных разведений на среде для культивирования клеток. Этими разведениями заражали клетки перmissive линии, рассеянные в 96-луночные планшеты. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 72 ч. По окончании инкубации визуально оценивали наличие ЦПД в лунках. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в логарифмах числа 50% инфекционных доз.

5. Определение стадии вирусного цикла — мишени действия экстракта ладанника. Для определения стадии жизненного цикла вируса гриппа, на которой экстракт ладанника проявляет максимальную активность, клетки MDCK рассеивали в 24-луночные планшеты и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 24 ч до формирования монослоя. Клетки отмывали от ростовой среды, после чего вносили в лунки вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (m.o.i. 1). Планшеты с клетками выдерживали в течение 1 ч при температуре +4°C. Затем вирус удаляли и промывали планшеты два раза чистой культуральной средой. Далее, в точке 0, в клетки вносили препарат и помещали планшет в CO₂ — инкубатор при 36°C. Экстракт ладанника вносили в следующие сроки относительно добавления вируса: (-2) — препарат внесен за час до добавления вируса, (-1) — 0 — одновременно с вирусом, а также через 2, 4 и 6 ч после заражения. В качестве позитивного контроля использовали интервал (-2) — 8, где экстракт ладанника присутствовал в течение всего эксперимента.

После окончания эксперимента из супернатанта в лунках готовили серию десятикратных разведений (10⁻²–10⁻⁷) и вносили в 96-луночные планшеты с монослойной культурой клеток MDCK. Планшеты инкубировали в течение 48 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Результаты эксперимента учитывали с помощью реакции гемагглютинации (см. далее). Вирусные титры выражали в lgTCID₅₀/0,2 мл.

6. Реакция гемагглютинации. Для определения наличия вируса гриппа в культуральной жидкости проводили реакцию гемагглютинации. Для этого культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объём 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты инкубировали при 20°C в течение 1 ч, после чего визуально проводили учёт результатов. Положительным считали результат реакции, при котором эритроциты равномерно покрывали всё дно лунки. При отрицательной реакции эритроциты в виде маленького диска или «пуговки» располагались в центре дна анализируемой лунки планшета. За титр вируса принимали наибольшее

разведение вирусосодержащего материала, при котором наблюдалась положительная реакция гемагглютинации.

7. Изучение антифузогенной активности экстракта ладанника шалфейлистного в отношении гемагглютинирующего вируса гриппа. Метод оценки фузогенной активности вирусного гемагглютинирующего экстракта был адаптирован из протокола [8]. Метод основан на том, что при кислом pH происходит активация гемагглютинирующей мембраны, что индуцирует слияние вирусной и эритроцитарной мембран, разрушение эритроцита и высвобождение во внеклеточную среду гемоглобина, концентрация которого измеряется спектрофотометрически.

Для постановки теста использовали 96-луночный планшет с U-образным дном лунок. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора изучаемого препарата в конечной концентрации 50 мкг/мл и 50 мкл изучаемого вируса гриппа. Планшеты инкубировали в течение 60 мин при +37°C. В качестве контроля вместо вирусов использовали физиологический раствор. После инкубации добавляли 100 мкл 1% суспензии куриных эритроцитов и инкубировали 60 мин при +4°C. Затем 150 мкл жидкости аккуратно удаляли, не задевая осевших эритроцитов, добавляли 150 мкл MES-буфера (32,5мМ MES-гидрат, Sigma-M5287, 4мМ CaCl₂ pH=5,0) и инкубировали в течение 1,5 ч при +37°C. Планшеты центрифугировали 15 мин при 2000 об./мин для осаждения интактных эритроцитов и остатков мембран, отбирали 100 мкл жидкости и переносили в планшет для измерения оптической плотности при длине волны 405 нм (OD₄₀₅). Об активности соединения судили по снижению OD₄₀₅ по сравнению с контролем без соединения.

8. Изучение анти-рецепторсвязывающей активности экстракта ладанника в отношении гемагглютинирующего вируса гриппа. Для изучения механизма активности экстракта ладанника шалфейлистного была изучена его способность блокировать связывание вирионов гриппа с клеточной мембраной. Для этого использовали вирусы гриппа разных типов и подтипов, накопленные в аллантоисной жидкости. Из вирусосодержащего материала готовили серию двукратных разведений от 1:2 до 1:1024. В лунках круглодонного планшета эти разведения (100 мкл на лунку) смешивали с равным объемом 1% куриных эритроцитов, инкубировали в течение 1 ч при 20°C, после чего проводили визуальный учёт гемагглютинации. За гемагглютинирующий титр вируса принимали последнее его разведение, при котором отмечалась положительная реакция гемагглютинации (см. п. 7).

Из экстракта ладанника готовили серию двукратных разведений (200–12,5 мкг/мл). Вирус в дозе 1, 2, 4 и 8 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) смешивали с равным объемом экстракта ладанника в диапазоне концентраций, инкубировали 1 ч при 20°C, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 20°C, после чего проводили визуальный учёт гемагглютинации. Об активности экстракта ладанника судили по его способности блокировать вирусиндуцированную агглютинацию эритроцитов.

9. Электронно-микроскопические исследования. Для морфологического изучения процесса сорбции вирионов на плазматическую мембрану клетки MDCK, выращенные в лунках 6-луночного планшета инкубировали в течение 1 ч при +4°C с вирусосодержащей жидкостью в объеме 1 мл (5×10⁶

TCID₅₀). Несвязавшийся вирус отмывали 2 раза по 5 мин средой для культур клеток, клетки соскабливали со дна лунок, центрифугировали 15 мин при 2000 об./мин, после чего полученный клеточный осадок фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом на среде DMEM (pH 7,2) и 2,5% раствором OsO₄. Клетки обезвоживали ацетоном в возрастающей концентрации и заливали в смесь эпон/аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония) при инструментальном увеличении 5000–50000.

10. Оценка протективной активности экстракта ладанника шалфейлистного в опытах *in vivo*. Экстракт ладанника шалфейлистного растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия до концентрации 200 мкг/мл. Лабораторных животных (белые мыши линии Balb/c, самки, возраст 6–8 нед.) разделяли на 8 групп по 15 животных в группе. Полученный раствор вводили мышам интраназально под лёгким эфирным наркозом в объёме 30 мкл за 3 (группа 1), 1,5 (группа 2) или 0,5 (группа 3) часа до заражения вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Животных 4-й группы инфицировали вирусом сразу после введения раствора экстракта ладанника, животных 5-й группы инфицировали вирусом, предварительно инкубированным с экстрактом ладанника (200 мкг/мл) в течение 1 ч при +4°C. Животные 6-й группы получали перорально при помощи желудочного зонда один раз в сутки раствор осельтамивира фосфата (Тамифлю) в объёме 0,2 мл и дозе 20 мг/кг. Животные 7-й группы были инфицированы вирусом и не получали никаких препаратов.

Мышей заражали интраназально под лёгким эфирным наркозом вирусом в дозе 5×10⁵ TCID₅₀ на мыш в объёме 30 мкл. Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней. Ежедневно фиксировали смертность в каждой группе опыта. На основании полученных данных высчитывали процент смертности в каждой из групп и индекс защиты — отношение разницы в гибели контрольной и опытной группы к проценту гибели в контрольной группе.

11. Статистическая обработка результатов. Расчёт значений 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀) и 50% эффективной концентрации (IC₅₀) проводили при помощи пакета программ GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» — «логарифм ингибитора — ответ»). На основании полученных данных для каждого соединения и каждого вируса рассчитывали индекс селективности (SI) — отношение CC₅₀ к IC₅₀. Достоверность различий в выживаемости животных проводили при помощи анализа кривых выживаемости Каплана–Мейера по методу Мантела–Кокса пакета программ GraphPad Prism 6.01. Достоверными считали различия между группами, если параметр *p* не превышал 0,05.

Результаты исследования

1. Определение стадии вирусного цикла — мишени действия препарата. Для определения стадии жизненного цикла вируса, на которой экстракт

Таблица 1. Инфекционная активность вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в клетках MDCK в условиях применения экстракта ладанника шалфейлистного в зависимости от срока его добавления в культуру

Время присутствия экстракта ладанника, ч	Инфекционный титр вирусного потомства, lg TCID ₅₀ /0,2 мл	<i>p</i> *
(-2)–8	1,3±0,6	0,0011
(-2)–(-1)	4,7±0,6	0,2302
(-1)–0	1,7±0,6	0,0015
0–8	1,7±0,6	0,0015
2–8	2,3±0,6	0,0031
4–8	3,7±0,6	0,0241
6–8	4,0±0,0	0,0572
Контроль вируса	5,3±0,6	1,0000

Примечание. * — коэффициент Стьюдента при сравнении с группой контроля вируса.

ладанника шалфеелистного проявляет максимальную противовирусную активность, его добавляли к инфицированной культуре клеток в различные моменты времени по отношению к моменту заражения, затем после прохождения одного вирусного цикла (8 ч) оценивали инфекционную активность сформировавшегося вирусного потомства. Результаты опыта суммированы в табл. 1. и для наглядности представлены на рис. 1.

Как видно из представленных данных, присутствие экстракта ладанника на всём протяжении эксперимента (от точки -2 до точки 8 ч после инфицирования) приводила к достоверному снижению активности продукции инфекционного вируса на 4 порядка. При этом предварительная инкубация клеток с экстрактом ладанника (от -2 до -1 ч, т. е. за час до инфицирования) не влияла на титр вируса, что позволяет утверждать, что экстракт ладанника воздействует на вирусную, а не на клеточную мишень.

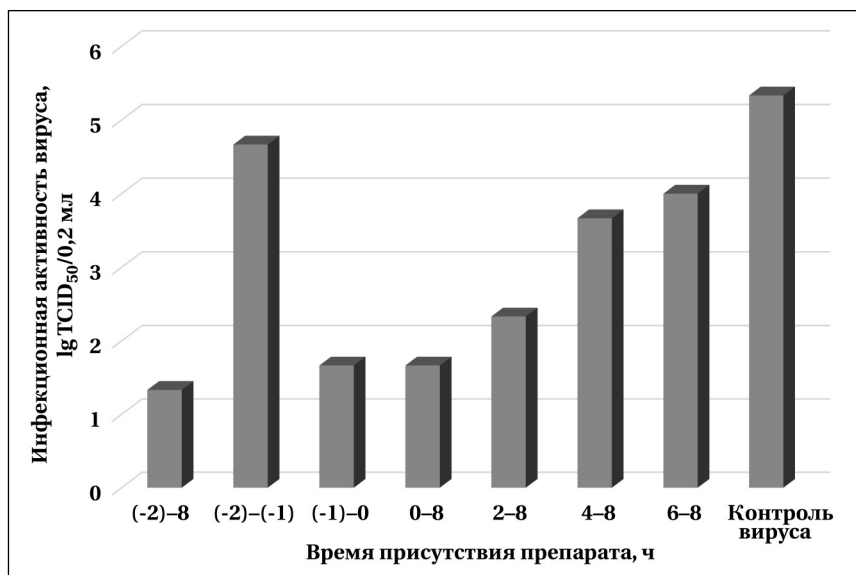


Рис. 1. Влияние экстракта ладанника шалфеелистного на инфекционную активность вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в клетках MDCK в зависимости от времени добавления в культуру.

Инкубация заражённых клеток с экстрактом ладанника на всех остальных стадиях вирусной репродукции приводила к снижению инфекционной активности вирусного потомства. Этот эффект был наиболее выражен при одновременной инкубации кле-

Таблица 2. Антирецепторсвязывающая активность экстракта ладанника шалфеелистного в отношении гемагглютинаина вирусов гриппа разных типов и подтипов

Вирус гриппа	Гемагглютинирующий титр вируса (ГАЕ/0,05 мл) в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного, мкг/мл					
	200	100	50	25	12,5	0
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	>1:512	>1:512	<1:64	<1:64	1:128	1:512
A/California/07/09 (H1N1)pdm09	>1:256	>1:256	<1:32	<1:32	1:32	1:256
A/Aichi/2/68 (H3N2)	>1:256	>1:256	<1:32	<1:32	1:32	1:256
A/mallard/Pennsylvania/1984 (H5N2)	>1:1024	>1:1024	1:256	1:256	1:256	1:1024
A/Anhui/1/13 (H7N9)	>1:256	>1:256	<1:32	<1:32	1:64	1:256
B/Florida/04/06	>1:512	>1:512	<1:64	<1:64	<1:64	1:512

Примечание. Цветом выделены значения гемагглютинирующего титра, обусловленные неспецифическим связыванием компонентов экстракта с эритроцитами.

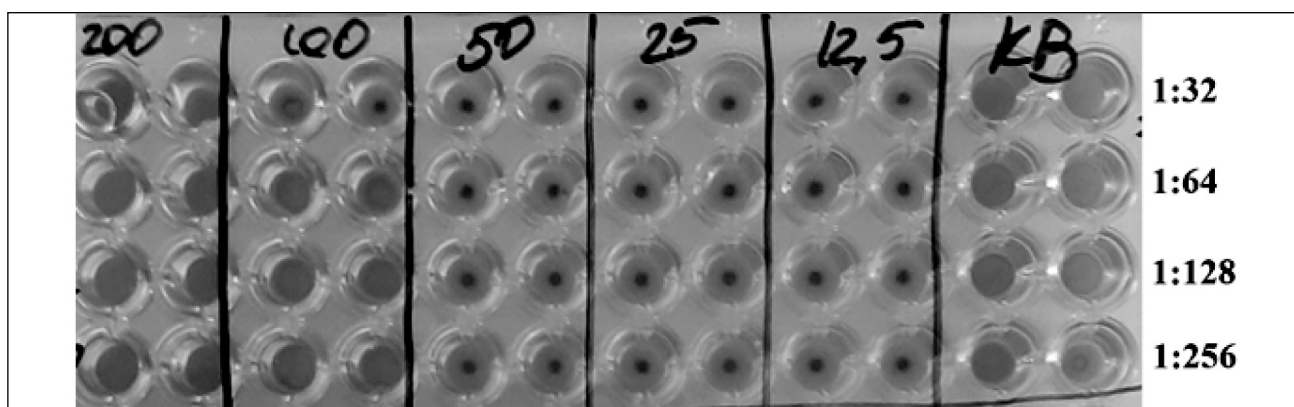


Рис. 2. Ингибирование рецепторсвязывающей активности гемагглютинаина вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) экстрактом ладанника шалфеелистного.

По вертикали — разведения вируса. По горизонтали — концентрация экстракта ладанника (мкг/мл).

Таблица 3. Фузогенная активность гемагглютинаина вирусов гриппа в присутствии экстракта ладанника

Состав реакционной смеси	OD ₄₀₅ в присутствии вируса*					
	PR	PN	AN	AI	CL	FL
Э	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Э+В	-0,0036	0,0514	0,0708	0,0068	0,0008	0,0720
Э+М	0,0184	0,0665	0,0732	0,0285	0,0754	0,0674
Э+В+М	0,0652	0,1077	0,1387	0,0964	0,0763	0,1743
Э+Л	0,0573	0,0703	0,0740	0,0470	0,0672	0,0561
Э+Л+М	0,1546	0,1546	0,1505	0,1192	0,1608	0,2568
Э+Л+М+В	0,1607	0,2185	0,2125	0,1341	0,2104	0,2208

Примечание. Э – эритроциты; В – вирус; М – MES-буфер; Л – экстракт ладанника. Обозначения вирусов: PR – A/Puerto Rico/8/34 (H1N1); PN – A/mallard/Pennsylvania/1984 (H5N2); AN – A/Anhui/1/13 (H7N9); AI – A/Aichi/2/68 (H3N2); CL – A/California/07/09 (H1N1)pdm09; FL – B/Florida/04/06. * – значения оптической плотности представлены за вычетом фона пустых лунок и фона эритроцитов.

ток с вирусом и экстрактом (–1–0 ч), а также на ранних стадиях вирусного цикла (0–2 ч после инфицирования). При добавлении экстракта ладанника на более поздних стадиях его ингибирующее влияние ослабевало, однако разница в титрах вируса с контрольной группой оставалась достоверной вплоть до срока 4 ч после инфицирования клеток.

2. Оценка способности препарата ингибировать рецепторсвязывающую активность гемагглютинаина вируса гриппа. Для расшифровки механизмов способности экстракта ладанника блокировать ранние этапы репродукции вируса гриппа была изучена его способность блокировать рецепторсвязывающую активность вирусного гемагглютинаина. Результаты тестирования суммированы в табл. 2 и на для иллюстрации представлены на рис. 2.

Как видно из представленных данных, использование экстракта ладанника приводило к потере вирусом гемагглютинирующих свойств. Так, уже в наименьшей из использованных концентраций экстракт ладанника снижал гемагглютинирующую активность вируса гриппа минимум в 8 раз.

3. Оценка способности препарата ингибировать фузогенную активность гемагглютинаина вируса гриппа. Следующая стадия исследований была посвящена изучению антифузогенных свойств экстракта ладанника шалфеелистного. С этой целью была использована тест-система, в которой активность вирусного гемагглютинаина приводила к лизису эритроцитов, степень которого можно было измерить количественно как оптическую плотность раствора, обусловленную выходом из эритроцитов свободного гемоглобина. При наличии у изучаемого препарата ингибирующих свойств добавление его в

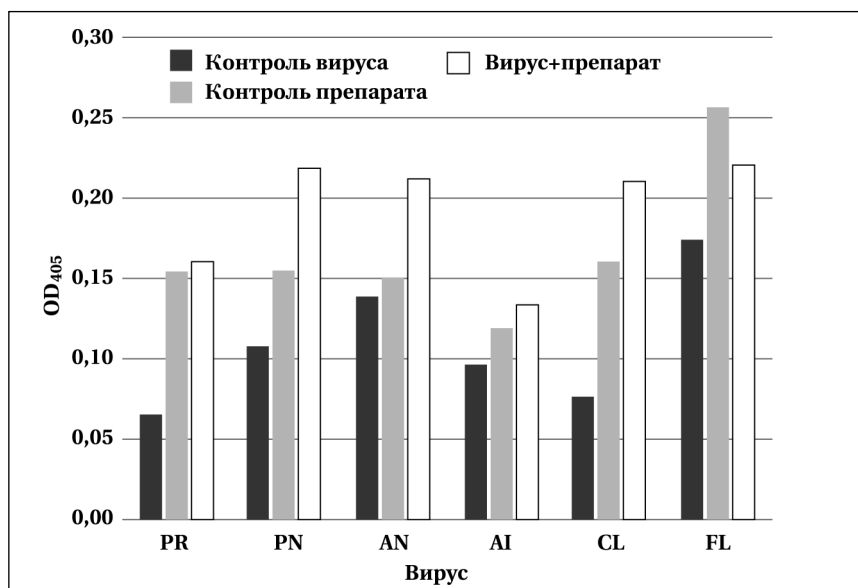


Рис. 3. Фузогенная активность гемагглютинаина вирусов гриппа в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного.

Обозначения вирусов: PR – A/Puerto Rico/8/34 (H1N1); PN – A/mallard/Pennsylvania/1984 (H5N2); AN – A/Anhui/1/13 (H7N9); AI – A/Aichi/2/68 (H3N2); CL – A/California/07/09 (H1N1)pdm09; FL – B/Florida/04/06.

такую систему должно приводить к снижению оптической плотности благодаря угнетению мембранотропной активности гемагглютинаина.

Результаты, полученные в ходе опыта, суммированы в табл. 3 и для наглядности представлены на рис. 3.

Как видно из представленных данных, само по себе закисление среды в присутствии экстракта ладанника (см. табл. 3, группа опыта Э+Л+М) приводило к деструкции мембраны эритроцитов, что проявлялось в повышении OD₄₅₀. Введение в такую реакционную смесь вируса гриппа приводило к дополнительному повышению, а не снижению, показателя OD₄₅₀ (см. табл. 3, группа опыта Э+Л+М+В). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что экстракт ладанника не обладает антифузогенной активностью в отношении вирусного гемагглютинаина, и что его

НА-блокирующие свойства обусловлены исключительно рецепторсвязывающим действием.

4. Изучение ингибирующей активности препарата в отношении респираторных вирусов человека. На следующей стадии исследования была изучена вирусингибирующая активность экстракта ладанника в отношении респираторных вирусов человека в опытах *in vitro*. В качестве критериев эффективности для каждой линии клеток рассматривались значения IC_{50} и снижение титра вируса (ΔT) при максимальной нетоксичной концентрации экстракта ладанника. Полученные данные представлены в разделах 4.1–4.2 и суммированы на рис. 4.

4.1. Аденовирус (Ad5). Результаты изучения активности экстракта ладанника в отношении аденовируса человека суммированы в табл. 4.

Видно, что экстракт ладанника проявляет дозозависимую активность в отношении аденовируса человека. Основываясь на полученных данных, значение IC_{50} было рассчитано как 29,3 мкг/мл, что с учётом показателей цитотоксичности (190 мкг/мл) даёт значение индекса селективности 6. Максимальная нетоксичная концентрация экстракта снижала вирусный титр на 3 порядка.

4.2. Вирус парагриппа человека. Результаты изучения активности экстракта ладанника в отношении вируса парагриппа человека суммированы в табл. 5.

Видно, что экстракт ладанника проявляет дозозависимую активность в отношении вируса парагриппа человека. Основываясь на полученных данных, значение IC_{50} было рассчитано как 10,5 мкг/мл, что с учётом показателей цитотоксичности (190 мкг/мл) даёт значение индекса селективности 18, что характерно для препаратов с выраженной противовирусной активностью. Максимальная нетоксичная концентрация экстракта снижала вирусный титр на 2,3 порядка.

5. Изучение способности экстракта ладанника шалфеелистного блокировать сорбцию вирионов гриппа на клетках-мишенях. Для подтверждения данных о способности экстракта ладанника блокировать сорбцию вирионов гриппа на поверхности клеток были проведены эксперименты по непосредственной визуализации этого процесса. С этой целью проводили сорбцию вирионов гриппа

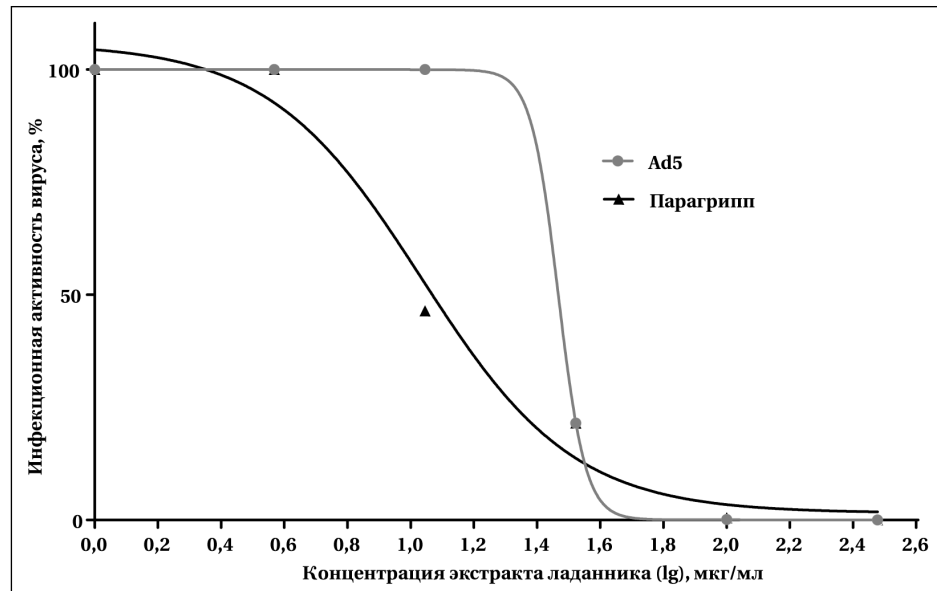


Рис. 4. Ингибирующая активность экстракта ладанника в отношении аденовируса человека и вируса парагриппа человека.

Таблица 4. Репродукция аденовируса человека 5-го типа в клетках Vero в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного

Концентрация препарата, мкг/мл	Титр аденовируса (lg TCID ₅₀ /0,2 мл)
0 (контроль вируса)	6,0±0,0
3	6,0±0,0
10	6,0±0,0
30	5,3±0,6
100	3,0±0,0
300	0,0±0,0
$IC_{50}=29,3$ мкг/мл	

Таблица 5. Репродукция парагриппа человека в клетках МА-104 в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного

Концентрация препарата, мкг/мл	Титр аденовируса (lg TCID ₅₀ /0,2 мл)
0 (контроль вируса)	4,0±0,0
3	4,0±0,0
10	3,7±0,6
30	3,3±0,6
100	1,7±0,6
300	0,3±0,6
$IC_{50}=10,8$ мкг/мл	

на клетках MDCK в присутствии и отсутствии экстракта, после чего клетки изучали при помощи электронной микроскопии.

Как было показано в ходе ультраструктурных исследований, клетки интактной культуры MDCK имели округлую или овальную форму и содержали крупное центрально расположенное ядро. Плазматическая мембрана была гладкой, на поверхности клеток отмечались отдельные микроворсинки. В цитоплазме находились многочисленные округлые или овальные митохондрии, вакуоли гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети. В вакуолях определялись рыхлые округлые тела

умеренной электронной плотности. Аппарат Гольджи был представлен скоплениями уплощённых цистерн, вакуолями и микропузырьками. Ядерный хроматин в нуклеоплазме в виде конденсатов располагался по всему объёму ядра или был частично смещен к периферии. В центре каждого ядра обнаруживались крупные ядрышки (рис. 5).

Через час после инкубации клеток с вирусом ультраструктура цитоплазмы и ядер не отличалась от соответствующих структур клеток интактной культуры. Однако на поверхности клеток отмечались многочисленные вирионы, сорбированные на плазматической мембране (рис. 6), что свидетельствует о наличии у использованного вируса полноценных молекул гемагглютинаина, обеспечивающих прикрепление вирусных частиц к клеточным рецепторам.

В случае инкубации клеток с вирусом в присутствии экстракта ладанника ультраструктура поверхности клеток кардинально отличалась от таковой в контрольных образцах без экстракта. Вирионы на поверхности клеток практически отсутствовали, и морфология клеточной поверхности была практически идентичной интактным клеткам MDCK (рис. 7).

Таким образом, полученные результаты служат дополнительным подтверждением того, что механизм действия экстракта ладанника заключается в блокировке процесса прикрепления вирусных частиц к поверхности клеток-мишеней.

6. Изучение протективной активности экстракта ладанника шалфеелистного на модели *in vivo*. Для исследования противовирусных свойств экстракта ладанника на модели гриппозной инфекции у животных были проведены эксперименты, направленные на изучения его способности снижать уровень гибели мышей при местном применении. Для этого экстракт ладанника вводили в дыхательные пути животных, после чего через различные промежутки времени животных заражали вирусом гриппа. При наличии у экстракта способности инактивировать вирионы и препятствовать их связыванию с клеткой

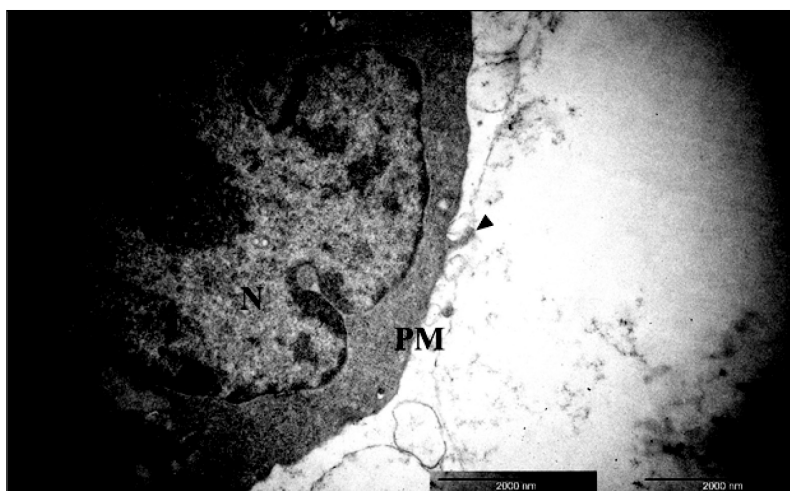


Рис. 5. Клетка интактной культуры MDCK.

N — ядро, Ns — ядрышко, PM — плазматическая мембрана. Стрелкой указана микроворсинка.

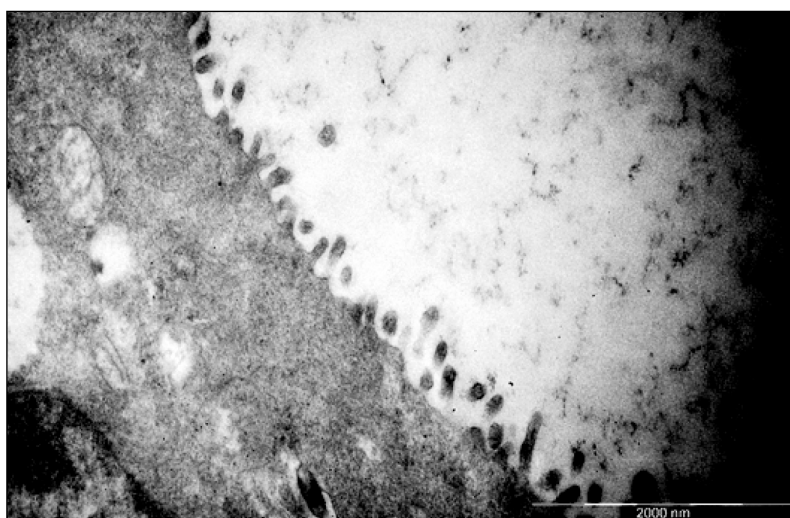


Рис. 6. Вирионы гриппа, сорбированные на поверхности клетки MDCK через 1 ч совместной инкубации.

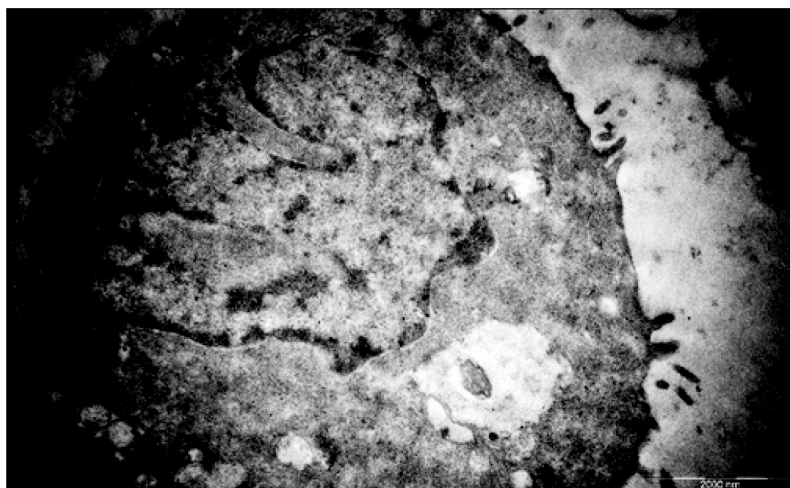
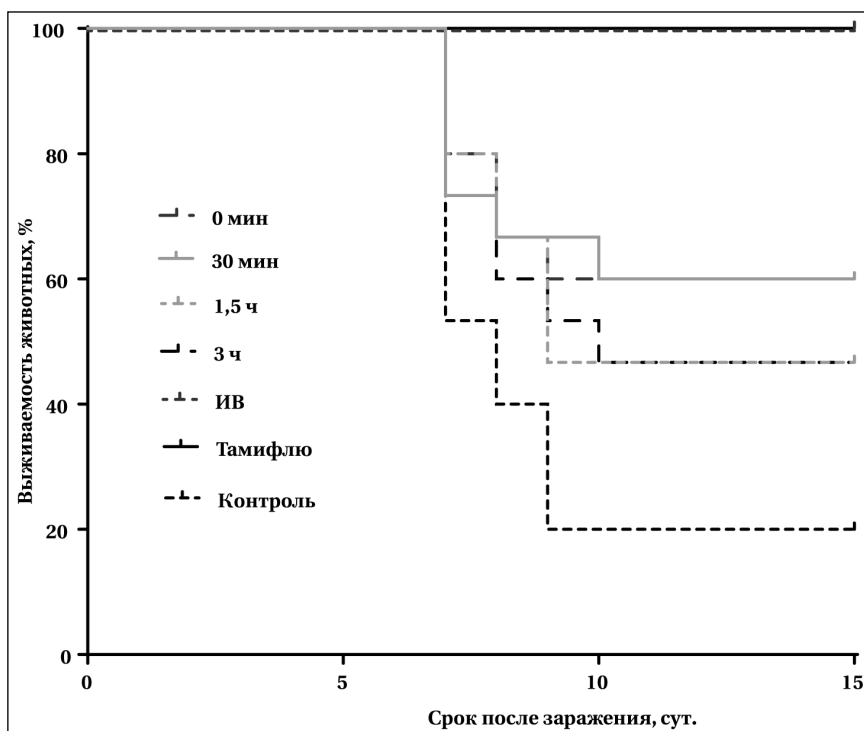


Рис. 7. Клетка MDCK после 1 ч инкубации с вирусом гриппа в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного.

Таблица 6. Протективная активность экстракта ладанника шалфеелистного на модели летальной гриппозной инфекции у белых мышей в зависимости от срока применения по отношению к моменту заражения

Группа опыта (время введения перед заражением)	Показатели патологического процесса			
	пало/заражено, шт.	смертность, %	индекс защиты, %	p^*
Группа 1 (3 ч)	8/15	53	29	0,1192
Группа 2 (1,5 ч)	8/15	53	29	0,0908
Группа 3 (30 мин)	6/15	40	47	0,0310
Группа 4 (0 мин)	6/15	40	47	0,0314
Группа 5 (предварительно инкубированный вирус)	0/15	0	100	<0,0001
Группа 6 (Тамифлю)	0/15	0	100	<0,0001
Группа 7 (контроль вируса)	12/15	75	0	1,0000

**Рис. 8.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в условиях применения экстракта ладанника шалфеелистного.

можно было ожидать снижения уровня смертности мышей по сравнению с контрольной группой.

Результаты исследования суммированы в табл. 6 и представлены на рис. 8.

Как видно из приведённых данных, инфицирование мышей вирусом гриппа приводило к гибели животных начиная с 7-го дня после инфицирования. В контрольной группе через 14 дней эксперимента гибель составила 75%. Использование препарата сравнения Тамифлю полностью предотвращало гибель животных (индекс защиты 100%).

Экстракт ладанника также проявлял протективную активность при местном применении по профилактической схеме перед заражением животных вирусом гриппа. Применение экстракта одновременно с заражением и за 30 мин до заражения приводило к достоверному снижению гибели животных. Со временем степень защитного

действия снижалась, и через 1,5 и 3 ч после применения экстракта достоверных различий не отмечалось, хотя смертность в этих группах была также ниже, чем в контроле.

Предварительная инкубация вируса с экстрактом ладанника приводила к полной потере вирусом инфекционной активности. Заражение животных таким вирусом вообще не приводило к гибели животных.

Таким образом, полученные данные подтверждают способность экстракта ладанника к блокировке вирусных белков, обеспечивающих связывание вируса с клеткой, что объясняет его длительное профилактическое действие на модели гриппозной инфекции у мышей.

Обсуждение результатов

Противовирусная активность экстрактов растений рода *Cistus* продемонстрирована во

многих исследованиях. Так, благодаря присутствию терпеноидов лабданового типа экстракт критского ладанника *Cistus creticus* L. ингибирует репродукцию вируса Денге [9], экстракт *Cistus incanus* блокирует ВИЧ-1 и -2, а также псевдовirus с поверхностными белками вирусов Эбола и Марбург [10]. Ранее нами были показаны противогриппозные свойства экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) [7]. Таким образом, как наши данные, так и результаты других лабораторий свидетельствуют о высоком противовирусном потенциале растений этого рода.

В настоящем исследовании показана ингибирующая активность экстракта ладанника шалфеелистного против респираторных вирусов человека — гриппа А различных подтипов, гриппа В, вируса парагриппа, аденовируса 5 типа. Максимальную вирусингибирующую

шую активность экстракт ладанника проявляет при одновременной инкубации клеток с вирусом и экстрактом (-1–0 ч), а также на ранних стадиях вирусного цикла (0–2 ч после инфицирования). Полученная временная характеристика активности экстракта ладанника позволяет предполагать, что его противовирусный эффект имеет комплексный характер, и что в его составе содержатся компоненты, блокирующие вирусную репродукцию на разных сроках.

Состав экстракта ладанника был изучен в нескольких работах [11–14]. Было показано, что среди вторичных метаболитов экстракта в большом количестве содержатся вещества полифенольной природы — гликозилированные и негликозилированные флавоноиды, катехины, таннины, антоцианидины, ряд алкалоидов, моно-, ди- и сесквитерпены и др. Для некоторых из этих соединений была изучена их противовирусная, в том числе противогриппозная, активность. Так, было показано, что полифенольные соединения способны блокировать опосредованную MAP-киназами передачу сигнала, контролирующего ядерно-цитоплазматический транспорт рибонуклеопротеинов вируса гриппа, а также редокс-чувствительные сигнальные пути, контролирующие процессинг вирусного гемагглютинина [15]. При помощи компьютерного моделирования было продемонстрировано, что полифенольные соединения класса флавоноидов и их производных способны связываться с активным центром вирусной нейраминидазы [16].

Ведущим механизмом, однако, является ингибирование ранних этапов вирусной репродукции, в том числе процесса сорбции вируса на клетки при контакте экстракта ладанника с внеклеточными вирионами. Экстракт ладанника приводил к потере вирусами гриппа гемагглютинирующих свойств. Этот эффект был продемонстрирован нами в отношении широкого спектра вирусов, различающихся по типу и подтипу, в том числе вирусов гриппа птиц H5N2 и H7N9. При этом экстракт ладанника не проявлял антифузогенной активности в отношении вирусного гемагглютинина. Аналогичные свойства были показаны для конъюгатов тритерпеновых соединений с полифенольными фрагментами [17]. Индивидуальные соединения растительного происхождения класса полифенолов (хлорогеновая кислота, кверцетин, кемпферол и их производные) также обладали способностью блокировать сорбцию вируса гриппа на поверхности клеток [18], что говорит о соответствии наших данных и данных, полученных в других лабораториях. Более того, при помощи электронной микроскопии нами непосредственно показано, что

экстракт ладанника препятствует сорбции вирусных частиц на клетке, что проявляется резко сниженным их количеством по сравнению с контрольной клеточной культурой.

В настоящем исследовании также показано, что экстракт ладанника проявляет дозозависимую активность в отношении аденовируса человека и вируса парагриппа человека. Вирус парагриппа оказался наиболее чувствителен к действию экстракта, тогда как активность его в отношении аденовируса была умеренной. Такие результаты можно объяснить разными способами проникновения в клетку оболочечных (грипп, парагрипп) и безоболочечных (аденовирус) вирусов. Возможно, белок слияния вируса парагриппа, как и гемагглютинин вируса гриппа, является мишенью для компонентов экстракта благодаря структурному и функциональному сходству этих белков, тогда как аденовирус проникает в клетку при помощи других механизмов.

Наконец, нами показано, что экстракт ладанника обладает протективной активностью при местном применении перед заражением животных вирусом гриппа. Применение экстракта одновременно с заражением и за 30 мин до заражения приводило к достоверному снижению гибели животных. Со временем степень защитного действия снижалась, и через 1,5 и 3 ч после применения экстракта достоверных различий не отмечалось, хотя смертность в этих группах была также ниже, чем в контроле. При этом предварительная инкубация вируса с экстрактом ладанника приводила к полной потере вирусом инфекционной активности. Заражение животных таким вирусом вообще не приводило к гибели животных. Полученные данные подтверждают способность экстракта ладанника к блокировке вирусных белков, обеспечивающих связывание вируса с клеткой, что объясняет его длительное профилактическое действие на модели гриппозной инфекции у мышей.

В целом, можно заключить, что комплексный химический состав экстракта ладанника обеспечивает его многофакторное ингибирующее действие на вирус гриппа. Благодаря наличию разных соединений, воздействующих на разные вирусные мишени и стадии вирусной репродукции, экстракт ладанника обладает высокой степенью и широким спектром противовирусной активности, и с этой точки зрения его можно рассматривать как эффективное комплексное противовирусное средство. Следует также отметить, что в отношении такого средства маловероятно развитие вирусной резистентности, поскольку в этом случае от устойчивого вируса потребуются одновременное приобретение мутаций в разных генах, кодирующих разные вирусные мишени [19].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ruuskanen O., Meurman O., Sarkkinen H. Adenoviral diseases in children: a study of 105 cases. *Pediatrics* 1985; 76: 79–83.
2. Samson M., Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res* 2013; 98 (2): 174–185.
3. Steel J., Lowen A.C. Influenza A virus reassortment. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 385: 377–401.
4. Ehrhardt C., Hrinčius E.R., Korte V. et al. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res* 2007; 76: 1: 338–347.
5. Droebner K., Ehrhardt C., Poetter A. et al. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res* 2007; 76: 1: 1–10.
6. Kalus U., Grigorov A., Kadecki O. et al. *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Res* 2009; 84: 3: 267–271.
7. Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Зарубаев В.В. Противовирусная активность экстракта ладанника шалфейлистного (*Cistus salvifolius*) в отношении вируса гриппа. Антибиотики и химиотер. — 2017. — Т. 62. — № 5–6. — С.12–20. / Lavrent'eva I.N., Sukhobaevskaya L.P., Zarubaev V.V. Protivovirusnaya aktivnost' ekstrakta ladannika shalfeelistnogo (*Cistus salvifolius*) v otnoshenii virusa grippa. Antibiotiki i Khimioter 2017; 62 (5–6): 12–20. [in Russian]
8. Maeda T., Kawasaki K., Ohnishi S. Interaction of influenza virus hemagglutinin with target membrane lipids is a key step in virus-induced hemolysis and fusion at pH 5.2 *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78 (7): 4133–4137.
9. Kuchta K., Tung N.H., Ohta T., Raekiansyah M., Grötzinger K., Rausch H., Shoyama Y., Rauwald H.W., Morita K. The old pharmaceutical oleoresin labdanum of *Cistus creticus* L. exerts pronounced *in vitro* anti-dengue virus activity. *J Ethnopharmacol* 2020; 257: 112316.
10. Rebensburg S., Helfer M., Schneider M., Koppensteiner H., Eberle J., Schindler M., Gürtler L., Brack-Werner R. Potent *in vitro* antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. *Sci Rep* 2016; 6: 20394.
11. Dimcheva V., Kaloyanov N., Karsheva M. The polyphenol composition of *Cistus incanus* L., *Trachystemon orientalis* L. and *Melissa officinalis* L. infusions by HPLC-DAD method. *Open J Anal Bioanal Chem* 2019; 3 (1): 031–038.
12. Sayah K., Marmouzi I., Naceiri Mrabti H., Cherrah Y., Faouzi M.E. Antioxidant activity and inhibitory potential of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aerial parts extracts against key enzymes linked to hyperglycemia. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 2789482. doi.org/10.1155/2017/2789482
13. Papaefthimiou D., Papanikolaou A., Falara V., Givanoudi S., Kostas S., Kanellis A.K. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem* 2014; 2: 35.
14. Barrajón-Catalán E., Fernández-Arroyo S., Roldán C., Guillén E., Saura D., Segura-Carretero A., Micol V. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem Anal* 2011; 22 (4): 303–312.
15. Fioravanti R., Celestino I., Costi R., Cuzzucoli Crucitti G., Pescatori L., Mattiello L., Novellino E., Checconi P., Palamara A.T., Nencioni L., Di Santo R. Effects of polyphenol compounds on influenza A virus replication and definition of their mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 2012; 20 (16): 5046–5052.
16. Sadati S.M., Gheibi N., Ranjbar S., Hashemzadeh M.S. Docking study of flavonoid derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase. *Biomed Rep* 2019; 10 (1): 33–38.
17. Li H., Li M., Xu R., Wang S., Zhang Y., Zhang L., Zhou D., Xiao S. Synthesis, structure activity relationship and *in vitro* anti-influenza virus activity of novel polyphenol-pentacyclic triterpene conjugates. *Eur J Med Chem* 2019; 163: 560–568.
18. Derksen A., Kühn J., Hafezi W., Sendker J., Ehrhardt C., Ludwig S., Hensel A. Antiviral activity of hydroalcoholic extract from *Eupatorium perfoliatum* L. against the attachment of influenza A virus. *J Ethnopharmacol* 2016; 188: 144–52.
19. Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., Manicassamy B. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance. *Curr Med Chem* 2018; 25 (38): 5115–5127.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Есаулкова Яна Леонидовна — младший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Мурылева Анна Андреевна — младший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Синегубова Екатерина Олеговна — младший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Беляевская Светлана Валентиновна — старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Гаршинина Анжелика Валерьевна — старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Киреева Марина Владимировна — студентка магистратуры каф. микробиологии биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского Государственного Университета, Санкт-Петербург

Волобуева Александрина Сергеевна — младший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Слита Александр Валентинович — к. б. н., старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Кадырова Рената Анваровна — старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Зарубаев Владимир Викторович — д. б. н., старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Коррекция экстрактом *Gentiana algida* Pall структурных изменений в тимусе при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии

В. Б. ХОБРАКОВА, *Я. Г. РАЗУВАЕВА, Е. Р. БУДАЕВА

ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ

Correction of Structural Changes in Thymus by *Gentiana algida* Pall Extract at Experimental Azathioprine Immunosuppression

V. B. KHOBRKOVA, *YA. G. RAZUVAEVA, E. R. BUDAEVA

Institute of General and Experimental Biology of SB RAS, Ulan-Ude

Цель: определение влияния экстракта сухого горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall) на микроанатомию тимуса мышей линии СВА в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на половозрелых мышках-самцах линии СВА. Экспериментальную иммуносупрессию вызывали цитостатиком азатиоприном (50 мг/кг, *per os*, 5 дней). Экстракт сухой *G. algida* в дозе 50 мг/кг вводили животным в течение 15 дней на фоне азатиоприна. Морфологические исследования тимуса проводили на 21-е сутки после начала введения азатиоприна. С помощью программы для анализа изображений Axio Vision SE64 Rel.4.8.3 измеряли: площадь дольки, коркового и мозгового вещества, ширину коркового вещества, толщину и длину мозгового вещества, толщину капсулы, плотность клеток в субкапсулярной зоне и глубоких слоях коркового вещества. В субкапсулярной и центральной зоне коркового вещества определяли клеточный состав. **Результаты.** Введение мышам экстракта *G. algida* ограничивало развитие инволютивных изменений в тимусе, вызванных цитостатиком азатиоприном: площадь коркового вещества была на 16% больше, а мозгового слоя — на 17% меньше по сравнению с таковыми у животных контрольной группы. Соотношение коркового и мозгового вещества у животных, получавших экстракт *G. algida*, было в 1,4 раза выше такового в контроле. Средняя плотность тимоцитов в субкапсулярной зоне была на 30% выше контрольного показателя. Количество бластов и больших лимфоцитов в глубоких слоях коркового вещества увеличилось в среднем в 2,0 раза, в субкапсулярной зоне — в 4,3 и 2,4 раза, соответственно, по сравнению с таковыми у контрольных животных. **Выводы.** Экстракт *G. algida* ограничивает развитие выраженных инволютивных процессов в вилочковой железе, вызванных введением азатиоприна, повышая митотическую активность тимоцитов, снижая степень выраженности деструктивных процессов и предотвращая разрастание жировой ткани.

Ключевые слова: азатиоприн, иммуносупрессия, тимус, *Gentiana algida* Pall.

The purpose of the study is to evaluate the effect of *Gentiana algida* Pall dry extract on microanatomy of CBA mice thymus at azathioprine immunosuppression. **Material and Methods.** Experiments were carried out on CBA male mice. Immune deficiency was modeled by intragastrical administration of azathioprine in the dose 50 mg/kg once a day for 5 days. The *G. algida* dry extract in the dose 50 mg/kg was administered to animals for 15 days against azathioprine. Morphological studies of the thymus were carried out on day 21 after the azathioprine administration. The area of the thymic lobule, the cortex and the medulla; the width of the cortex; the thickness and length of the medulla; the thickness of the capsule; the density of cells in the subcapsular zone and the deep layers of the cortex were measured using the Axio Vision SE64 Rel.4.8.3 image analysis program. The cellular composition was determined in the subcapsular and central zone of the cortex. **Results.** The *G. algida* extract limited the development of involutive changes in the thymus caused by cytostatic azathioprine: the cortex area was 16% higher and medulla area 17% lower compared with the control group. The ratio of cortex and medulla in experimental group was 1.4 times higher than that in the control group. The *G. algida* extract increased average density of cells by 30% in the subcapsular zone. The number of blasts and large lymphocytes increased on average by 2.0 times in the deep layers of the cortex, and in the subcapsular zone — by 4.3 and 2.4 times, respectively, compared with those in control group. **Conclusions:** *G. algida* extract limited the development of pronounced involutive processes in the thymus at azathioprine immunosuppression (increased the mitotic activity of thymocytes, reduced the severity of destructive processes and prevented the growth of adipose tissue).

Keywords: azathioprine, immunosuppression, thymus, *Gentiana algida* Pall.

Введение

Цитостатическая терапия, широко применяемая для лечения злокачественных опухолей, аутоиммунных заболеваний, в трансплантологии, сопряжена с развитием осложнений, связанных с по-

вреждающим действием цитостатических препаратов на различные органы и ткани, в частности, на органы иммунной системы [1, 2]. Для коррекции иммунодефицитов преимущественно используют препараты синтетического происхождения, которые являются чужеродными для организма и обуславливают массу побочных эффектов. Альтернативой такой терапии являются иммуномодуляторы растительного происхождения, которые имеют ряд

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, 670047. E-mail: tatur75@mail.ru

преимуществ, благодаря наличию в них комплекса биологически активных веществ, обеспечивающих мягкое действие, низкую токсичность, способность к активации не только иммунной, но и нервной, и эндокринной систем, а также возможность применения у лиц с сочетанными патологиями [3, 4].

С учётом имеющихся предпосылок, перспективным источником сырья для создания эффективных и безопасных иммуномодуляторов является горечавка холодная — *Gentiana algida* Pall. Ранее в экспериментах на животных было установлено, что экстракт *G.algida* обладает фармакотерапевтической эффективностью при азатиоприновой иммуносупрессии, восстанавливая массу и клеточность иммунных органов, показатели иммунитета в реакциях гиперчувствительности замедленного типа, антителообразования и фагоцитоза перитонеальных макрофагов [5, 6].

Цель работы — определение влияния экстракта сухого *G.algida* на микроанатомию тимуса мышей линии СВА в условиях азатиоприновой иммуносупрессии.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 30 половозрелых мышах-самцах линии СВА массой 18–20 г, из питомника РАМН «Столбовая». Животные находились в стандартных условиях вивария в соответствии с Правилами лабораторной практики (GLP) и приказом МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Эксперименты проведены в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19.06.2003 и Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Протокол исследований согласован с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол №7 от 12.11.2013). Из эксперимента животных выводили декапитацией под лёгким эфирным наркозом.

Животные были разделены на 3 группы: интактная, контрольная, опытная. Экспериментальную иммуносупрессию

вызывали цитостатиком азатиоприном (ОАО «Мосхимфарм-препараты» им. Н. А. Семашко, таблетки), который вводили животным контрольной и опытной групп в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней [7]. Животным опытной группы экстракт сухой *G.algida* вводили на 6-е сутки и далее в течение 15 дней в дозе 50 мг/кг перорально. Контрольная группа животных с иммунодефицитом получала эквивалентный объём очищенной воды в аналогичном режиме. На 21-е сутки животных декапитировали под эфирным наркозом и извлекали тимус для проведения патоморфологических исследований.

Морфологические исследования тимуса проводили при помощи общепринятой методики [8]. Тимус фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине с последующей стандартной спиртовой проводкой и заливкой в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и азур-эозином. Морфологические и морфометрические исследования проводили с помощью микроскопа «Axio LAB.A1» (Германия) с цифровой камерой «AxioCam ERc5s» (Германия) с программным обеспечением для анализа изображений Axio Vision SE64 Rel.4.8.3 и ZEN 2012. На срезах тимуса измеряли: площадь дольки, коркового и мозгового вещества, ширину коркового вещества, толщину и длину мозгового вещества, толщину капсулы, плотность клеток в субкапсулярной зоне и глубоких слоях коркового вещества, а также в мозговом слое. В субкапсулярной и центральной зоне коркового вещества определяли клеточный состав, подсчитывая число эпителиоретикулярных клеток, лимфоцитов, больших, средних и малых лимфоцитов, клетки с фигурами митоза, деструктивно изменённые клетки.

Результаты исследований статистически обработаны общепринятыми методами для малой выборки с определением средней величины (M) и ошибки (m). Степень достоверности результатов исследований (p) оценивали с помощью критерия t -Стьюдента. Различия между данными контроля и опыта считали достоверным при вероятности 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Патоморфологические исследования показали, что курсовое введение мышам азатиоприна вызывает инволютивные изменения в тимусе, характеризующиеся уменьшением размеров железы, снижением плотности тимоцитов и изменением их клеточного состава. Так, по данным морфо-

Влияние экстракта *G.algida* на морфометрические показатели тимуса мышей при азатиоприновой иммуносупрессии ($M \pm m$)

Показатели	Интактная, $n=10$	Контрольная (азатиоприн+H ₂ O), $n=10$	Опытная (азатиоприн+экстракт <i>G.algida</i>), $n=10$
Площадь дольки, мм ²	5,8±0,71	4,7±0,53	5,1±0,34
Площадь коркового вещества, мм ²	5,1±727845,9	3,7±0,42	4,3±2,9
Площадь мозгового вещества, мм ²	0,7±0,05	1,0±0,11	0,8±0,06
Ширина коркового вещества, мкм	281,0±16,07 (122–548)	220,2±5,87 (78–482)	244,3±10,86* (43–596)
Толщина мозгового вещества, мкм	228,7±4,20 (70–357)	316,8±10,26 (131–504)	257,4±11,09* (85–542)
Длина мозгового вещества, мкм	2274,3±316,90 (1498–4591)	4208,5±149,3 (3032–5118)	3706,6±308,9 (1853–5176)
Ширина коркового/ толщина мозгового вещества	1,23	0,69	0,95
Толщина капсулы, мкм	1,9±0,16 0,5–4	6,6±0,91 2–27	3,8±0,37* 2–15
Плотность тимоцитов в субкапсулярном слое коркового вещества, п/мм ²	28039,0±499,22	19948,8±822,33	25931,1±1198,05*
Плотность тимоцитов в глубоких слоях коркового вещества, п/мм ²	24851,1±1104,68	19993,2±495,98	22989,68±1041,68

Примечание. * — различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с данными в контрольной группе; n — число животных в каждой группе.

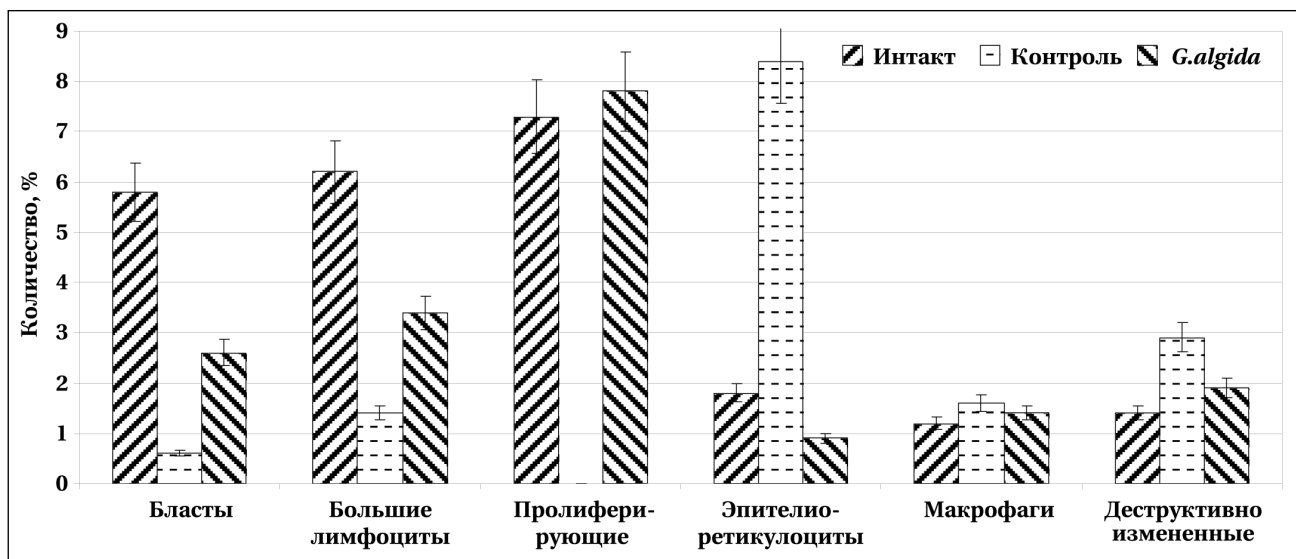


Рис. 1. Влияние экстракта *G.algida* на клеточный состав (%) субкапсулярной зоны коркового вещества тимуса белых крыс при азатиоприновой иммуносупрессии

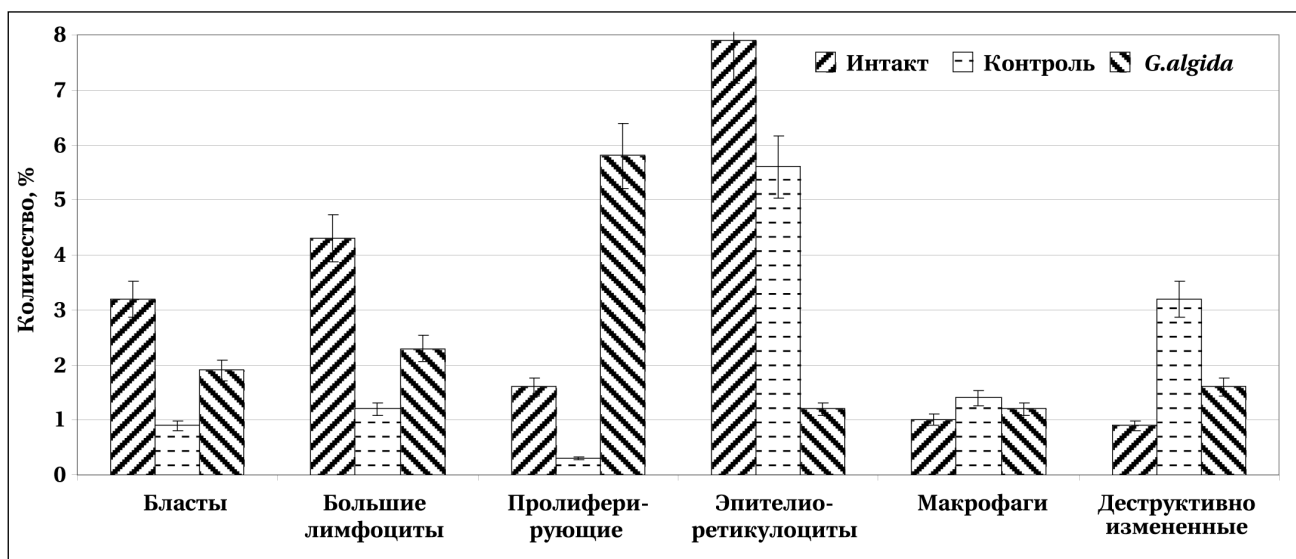


Рис. 2. Влияние экстракта *G.algida* на клеточный состав (%) центральных (глубоких) слоёв коркового вещества тимуса белых крыс при азатиоприновой иммуносупрессии

метрических исследований, площадь тимуса контрольных животных уменьшилась на 19% по сравнению с данными в интактной группе, при этом площадь коркового вещества сократилась на 27%, а площадь мозгового вещества увеличилась на 44% (см. таблицу).

В корковом веществе тимуса контрольных животных наблюдали снижение числа тимоцитов на единицу площади гистологического среза; наименее выраженное снижение плотности клеток отмечалось в субкапсулярном слое (на 20%), чем в глубоких слоях (на 29%). Уменьшение плотности лимфоцитов обусловлено несколькими причинами: во-первых, снижением пролиферативной активности тимоцитов на фоне действия азатиоприна. Так, в субкапсулярном слое коркового вещества

отсутствовали делящиеся тимоциты, в глубоких слоях их количество сократилось в 5,3 раза и составило $0,31 \pm 0,15$ против $1,6 \pm 0,17$ в интактной группе (рис. 1, 2). В субкапсулярном слое и глубоких слоях коркового вещества тимуса на фоне увеличения процентного содержания малых лимфоцитов число бластов снизилось в 3,6 и 9,7 раза, количество больших лимфоцитов — в 3,6 и 4,4 раза, соответственно. Во-вторых, наблюдался усиленный апоптоз тимоцитов: число деструктивных тимоцитов с пикнотическими ядрами в субкапсулярной и глубокой зонах коркового вещества тимуса увеличилось в 3,6 и 2,1 раза, соответственно, по сравнению с контролем. В-третьих, наблюдается повышенная миграция лимфоцитов из коркового вещества в мозговое, в результате чего чис-

ло клеток в последнем повышается. В результате изменения плотности клеток в мозговом и корковом слоях тимуса отмечалась так называемая «инверсия слоёв», когда мозговой слой на гистологических препаратах выглядит более тёмным, корковый слой — более светлым, а кортико-медулярная граница становится размытой.

У >50% мышей контрольной группы отмечались более выраженные инволютивные изменения тимуса, характеризующиеся замещением лимфоидной ткани железы фибробластами, фиброцитами и адипоцитами. На отдельных гистологических срезах капсула была отёчна, коллагеновые структуры разволокнены, тимоциты в субкапсулярной зоне замещались фибробластами, в результате чего наблюдалось утолщение капсулы. В некоторых случаях соединительная ткань разрасталась вглубь тимуса. Так, по данным морфометрических исследований, толщина капсулы тимуса у контрольных животных варьировала от 2 до 27 мкм, против 0,5–4 мкм в интактном, что в среднем в 3,5 раза больше. У 4 из 8 животных в капсуле наблюдались скопления жировых клеток, проникающих в субкапсулярную зону коркового вещества.

Усиленный апоптоз и миграция тимоцитов из коркового вещества тимуса приводят к уменьшению ширины данного слоя на 44% и увеличению толщины и длины мозгового вещества на 39% и 85%, соответственно, по сравнению с показателями у интактных животных. Соотношение ширины коркового вещества к толщине мозгового вещества в контроле составило 0,69 против 1,23 в интактной группе (см. таблицу).

Выявленные изменения структуры тимуса у животных, получавших экстракт *G.algida* на фоне азатиоприна, в целом, были сходны с изменениями, наблюдаемыми у контрольных животных; при этом степень их выраженности была значительно ниже. Так, у животных опытной группы инволютивные изменения также характеризовались уменьшением размеров тимуса и плотности клеток в корковом веществе, при этом ни у одного животного опытной группы жировой инфильтрации капсулы и дольки тимуса не наблюдалось. Соединительнотканная капсула была менее отёчна и разволокнена, её толщина была в среднем на 42% меньше таковой у животных контрольной группы. Не наблюдалось прорастание соединительной ткани вглубь тимуса. Так же как и в контрольной группе отмечались дилатация и кровенаполнения сосудов, что является компенсаторно-приспособительной реакцией.

Несмотря на то что общая площадь тимуса значимо не отличалась от показателя контрольных животных, площадь коркового вещества была на 16% выше, а мозгового слоя — на 17% ниже по сравнению с таковыми у животных контрольной группы. Соотношение коркового и мозгово-

го вещества у животных, получавших экстракт *G.algida*, составляло 0,95, что в 1,4 раза выше такового в контроле (см. таблицу). Кортико-медулярная граница была более чётко выражена. В центральной зоне коркового вещества отмечались небольшие опустошения, в результате чего средняя плотность тимоцитов была выше по отношению к контролю только на 15%, тогда как в субкапсулярной зоне — на 30%.

Введение мышам испытуемого фитоэкстракта на фоне азатиоприновой иммуносупрессии, помимо количественного показателя клеток, также нормализовала качественный состав клеток лимфоидного ряда. Так, у животных, получавших испытуемый экстракт, количество бластов и больших лимфоцитов в глубоких слоях коркового слоя увеличилось в среднем в 2,0 раза, в субкапсулярной зоне — в 4,3 и 2,4 раза, соответственно, по сравнению с таковыми у контрольных животных. У животных опытной группы в корковом веществе тимуса возросло число митозов и снизилось число деструктивных клеток.

Установленная нами иммунокорригирующая активность экстракта *G.algida* в отношении морфофункционального состояния тимуса в условиях иммуносупрессии подтверждается исследованиями [9], в которых установлено нормализующее влияние экстракта пятилистника кустарникового на структуру и функции данного органа при азатиоприновой иммуносупрессии. Кроме того, наши данные согласуются с результатами исследования [10], в котором показано восстановление морфофункционального состояния тимуса у животных, подвергнутых действию стресса, под влиянием полифенола розмариновой кислоты и флавонола лютеолина.

Таким образом, экстракт *G.algida* ограничивает развитие выраженных инволютивных процессов в вилочковой железе, вызванных введением азатиоприна, повышая митотическую активность тимоцитов, снижая степень выраженности деструктивных процессов и предотвращая разрастание жировой ткани. Полученные результаты по восстановлению изменений в микроанатомии тимуса и селезёнки мышей, находящихся в состоянии иммунодепрессии, с помощью морфометрического метода, согласуются с выявленными нами с помощью иммунологических методов иммунокорригирующими свойствами экстракта *G.algida* [5, 6]. Иммуномодулирующий эффект экстракта *G.algida* на фоне азатиоприновой иммуносупрессии обусловлен содержащимися в нём флавоноидами, полисахаридами, тритерпенами и иридоидами [11–13].

Исследования проведены в рамках выполнения темы госзадания № AAAA-A17-117011810037-0.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahlmann M., Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 78 (4): 661–671.
2. Orandi A.B., Vogel T.P., Keppel M.P., Uttersen E.C., Cooper M.A. Azathioprine-Associated Complete NK Cell Deficiency. *J Clin Immunol* 2017; 37 (6): 514–516.
3. Kumar S., Gupta P., Sharma S., Kumar D. A review on immunostimulatory plants. *J. of Chinese Integrative Med* 2011; 9 (2): 117–128.
4. Sultan M.T., Butt M.S., Qayyum M.M., Suleria H.A. Immunity: plants as effective mediators *Crit Rev. Food Sci. Nutr* 2014; 54(10): 1298–1308.
5. Хобракова В.Б., Будаева Е.Р., Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н. Иммуномодулирующая активность экстракта *Gentiana algida* Pall. *Химико-фармацевтический журнал*. — 2017. — Т. 51. — № 5. — С. 40–93. / *Khobrakova V.B., Budaeva E.R., Olennikov D.N., Zilfikarov I.N. Immunomoduliruyushchaya aktivnost' ekstrakta Gentiana algida* Pall. *Khimiko-Farmatsevticheskij Zhurnal* 2017; 51 (5): 40–93.
6. Будаева Е.Р., Хобракова В.Б. Влияние сухого экстракта *Gentiana algida* Pall на фагоцитарную активность макрофагов при экспериментальной иммуносупрессии. *Вестник Бурятского государственного университета*. — 2015. — № 12. — С. 96–99. / *Budaeva E.R., Khobrakova V.B. Vliyanie sukhogo ekstrakta Gentiana algida* Pall na fagotsitarnuyu aktivnost' makrofagov pri eksperimental'noj immunosupressii. *Vestnik Buryatskogo Gosudarstvennogo Universiteta* 2015; 12: 96–99. [in Russian]
7. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. М.: 1985. / *Lazareva D.N., Alekhin E.K. Stimulyatory immuniteta*. М.: 1985. [in Russian]
8. Коржевский О.Э., Гуляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: 2010. / *Korzhevskij O.E., Gilyarov A.V. Osnovy gistologicheskoy tekhniki*. SPb.: 2010. [in Russian]
9. Сапин М.Р., Хобракова В.Б., Кактурский Л.В., Григоренко Д.Е., Ерофеева Л.М., Николаев С.М. и соавт. Изменение микроанатомии тимуса мышей под влиянием сухого экстракта пятилистника кустарникового в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. — 2001. — № 1-2. — С. 120–127. / *Sapin M.R., Khobrakova V.B., Kakturskij L.V., Grigorenko D.E., Erofeeva L.M., Nikolaev S.M. i soavt. Izmenenie mikroanatomii timusa myshej pod vliyaniem sukhogo ekstrakta pyatilistnika kustarnikovogo v usloviyakh azatioprinovoy immunosupressii. Rossijskij Mediko-Biologicheskij Vestnik imeni Akademika I.P. Pavlova* 2001; 1–2: 120–127. [in Russian]
10. Цыбульский А.В., Попов А.М., Артюков А.А., Кривошапко О.Н., Козловская Э.П. Сравнительное изучение лечебного действия лютеолина, розмариновой кислоты и эхинохрома А на состояние тимуса при экспериментальном стрессе. *Российский аллергологический журнал*. — 2011. — 4 (1). — С. 411–413. / *Tsybul'skij A.V., Popov A.M., Artyukov A.A., Krivoschapko O.N., Kozlovskaya E.P. Sravnitel'noe izuchenie lechebnogo dejstviya l'yuteolina, rozmarinovoy kisloty i ekhinokhroma A na sostoyanie timusa pri eksperimental'nom stresse. Rossijskij Allergologicheskij Zhurnal* 2011; 4 (1): 411–413. [in Russian]
11. Будаева Е.Р., Хобракова В.Б. Влияние фракций, полученных из надземной части *Gentiana algida* Pall., на состояние клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. — 2015. — Т. 102. — № 2. — С. 70–72. / *Budaeva E.R. Khobrakova V.B. Vliyanie fraktsij, poluchennykh iz nadzemnoj chasti Gentiana algida* Pall., na sostoyanie kletochnogo i gumoral'nogo zven'ev immunnogo otveta. *Bjulleten' VSNTs SO RAMN* 2015; 102 (2): 70–72.
12. Будаева Е.Р., Хобракова В.Б. Иммунокорректирующее действие индивидуальных веществ из надземной части горечавки холодной. *Аллергология и иммунология*. — 2015. — Т. 16. — № 4. — С. 405–406. / *Budaeva E.R. Khobrakova V.B. Immunokorrigiruyushchee dejstvie individual'nykh veshchestv iz nadzemnoj chasti gorechavki kholodnoj. Allergologiya i immunologiya* 2015; 16 (4): 405–406. [in Russian]
13. Хобракова В.Б., Будаева Е.Р. Влияние ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты, выделенных из *Gentiana algida* Pall, на состояние иммунной системы в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. — 2018. — Т. 62. — № 1. — С. 54–58. / *Khobrakova V.B., Budaeva E.R. Vliyanie orientina, gentiopikrozida i oleanolovoy kisloty, vydelennykh iz Gentiana algida* Pall, na sostoyanie immunnnoj sistemy v eksperimente. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya* 2018; 62 (1): 54–58. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хобракова Валентина Бимбаевна — д. б. н., зав. лабораторией экспериментальной фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ. <http://orcid.org/0000-0002-4689-5706>

Разуваева Янина Геннадьевна — д. б. н., с. н. с. лаборатории безопасности биологически активных веществ Федерально-

го государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ. <http://orcid.org/0000-0001-7829-1424>

Будаева Евдокия Ринчиновна — к. м. н., н. с. лаборатории экспериментальной фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ. <http://orcid.org/0000-0001-9348-2368>

Антибиотикорезистентные уропатогенные *Escherichia coli*, выделенные от детей с врождёнными аномалиями развития мочевыделительной системы

С. СУАДКИА, *И. В. ПОДОПРИГОРА, Н. В. ЯШИНА, Л. Е. САРУХАНОВА, Э. Г. КРАВЦОВ

Российский университет дружбы народов, Москва

Antibiotic-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Children with Congenital Abnormalities of the Kidneys and Urinary Tract

S. SUADKIA, *I. V. PODOPRIGORA, N. V. YASHINA, L. E. SARUKHANOVA, E. G. KRAVTSOV

RUDN University, Moscow

Уропатогенная *Escherichia coli* (UPEC) представляет собой серьёзную проблему для здоровья людей во всем мире. Множественная лекарственная устойчивость UPEC в сочетании с факторами вирулентности является причиной серьёзной тревоги. В детском возрасте инфекции мочевыводящих путей имеют особую важность, так как могут протекать на фоне длительно не распознанных врождённых аномалий почек и мочевых путей. Из 106 клинических изолятов UPEC 63,2% культур было выделено из образцов мочи девочек и 36,8% — из образцов мочи мальчиков, что соответствует соотношению 1,7:1. Проведена оценка антибиотикорезистентности выделенных культур UPEC по отношению к 12 противомикробным препаратам. Среди протестированных культур 49% обладали множественной лекарственной устойчивостью, а 20,75% культур оказались резистентными к имипенему. Фенотипический анализ спектра антибиотикочувствительности уропатогенных *E.coli* ($n=106$) свидетельствует о высоком проценте встречаемости полирезистентных штаммов UPEC (49%) и имипенеморезистентных штаммов UPEC (20,75%) среди детей всех возрастных групп.

Ключевые слова: дети, инфекция мочевыводящих путей, *E.coli*, UPEC, множественная лекарственная устойчивость.

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is a serious health problem worldwide. UPEC's multiple drug resistance combined with virulence factors is a cause of serious concern. In childhood, urinary tract infections are of particular importance, since they can occur against the background of long-term unrecognized congenital anomalies of the kidneys and urinary tract. Of the 106 UPEC clinical isolates, 63.2% of cultures were isolated from girls' urine samples and 36.8% from boys' urine samples, which corresponds to a 1.7: 1 ratio. The antibiotic resistance of the isolated UPEC cultures was assessed in relation to 12 antimicrobial drugs. Among the tested cultures, 49% were multidrug-resistant and 20.75% were found to be resistant to imipenem. Phenotypic analysis of antibiotic susceptibility spectrum of uropathogenic *E.coli* ($n=106$) indicates a high percentage of occurrence of multi-resistant UPEC strains (49%) and imipenem-resistant UPEC strains (20.75%) among children of all age groups.

Keywords: children, urinary tract infection, *E.coli*, UPEC, multidrug resistance.

Введение

Ежегодно от инфекций мочевыводящих путей (ИМП) страдает около 150 млн человек во всём мире [1]. При данной патологии могут поражаться различные отделы мочевыводящей системы человека, включая почки, мочеточники, мочевого пузырь и мочеиспускательный канал. Клинически ИМП могут проявляться как в лёгкой, так и в тяжёлой форме. ИМП считается протекающей в лёгкой форме, когда она возникает у людей, в целом здоровых и не имеющих структурных или неврологических нарушений мочевыводящих путей [2, 3]. Осложнённые ИМП связаны с факторами, которые нарушают защиту мочевы-

водящих путей и могут включать: непроходимость мочи; задержку мочи, вызванную неврологическим заболеванием; иммуносупрессию; почечную недостаточность; трансплантацию почек; беременность и присутствие инородных тел, таких как камни, постоянные катетеры или другие дренажные устройства [4, 5].

Известно, что штаммы уропатогенной *Escherichia coli* (UPEC) несут в себе множество генов вирулентности (гены фимбрий (fimH) — 89%, гемолизина (hlyA) — 60%, аэробактина (aer) — 90%) [6], продукты которых участвуют в патогенезе ИМП [7–9]. Многие факторы патогенности позволяют уропатогенной *E.coli* преодолевать механизмы системы иммунной защиты хозяина [10, 11].

Распространение лекарственной устойчивости к антибиотикам широкого спектра действия и появление клональных групп с множественной

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: E-mail: podoprigora_iv@rudn.ru

лекарственной устойчивостью среди штаммов UPEC стало серьёзной проблемой здравоохранения во всем мире [6].

В детском возрасте ИМП имеют особую важность, так как могут протекать на фоне длительно не распознанных врождённых аномалий почек и мочевых путей и приводить к сморщиванию почек, хронической почечной недостаточности и гипертензии. Уропатогенная *E.coli* является основным этиологическим агентом, связанным с ИМП, в том числе и у детей [8].

Цель исследования — фенотипирование клинических изолятов UPEC, выделенных от детей с врождёнными аномалиями развития мочевыделительной системы, по чувствительности к антибиотикам.

Материал и методы

Всего было исследовано 106 клинических изолятов UPEC, выделенных из образцов мочи детей в возрасте от 6 мес. до 18 лет с врождённой патологией развития мочевыделительной системы: врождённый пузырно-мочеточниковый рефлюкс, врождённое расширение мочеточника, экстрофия мочевого пузыря, нейрогенная дисфункция мочевого пузыря, пузырно-мочеточниковый рефлюкс, врождённые аномалии почек и др. Изоляты UPEC хранили в пробирках типа «Криобокс» замороженными при температуре $-80 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Критериями включения в выборку были: пациенты обоего пола, возраст от 6 мес. до 18 лет, врождённая патология развития мочевыделительной системы. Критерии исключения не рассматривались.

Для посева использовали стандартные питательные среды: сердечно-мозговой агар/бульон «HiMedia laboratories» (Индия), среда UTI агар «HiMedia laboratories» (Индия), среда Мюллера—Хинтон агар «HiMedia laboratories» (Индия).

Тестирование культур UPEC на антибиотикорезистентность проводили на агаре Мюллера—Хинтон «HiMedia laboratories» (Индия) диско-диффузным методом. Картриджи, содержащие диски с антибиотиками «HiMedia laboratories» (Индия) хранили при температуре от $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ до $-20 \pm 0,5^\circ\text{C}$, перед использованием картриджи предварительно согревали до температуры $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

В работе использовали диски, пропитанные следующими антибиотиками: цефтазидим (CAZ, 30 мкг), триметоприм (TR, 30 мкг), цефтриаксон (CTR, 30 мкг), фосфомицин (FO, 200 мкг), цефазолин (CZ, 30 мкг), амоксилав (AMC, 30 мкг), цефтазидим с клавулановой кислотой (CAC, 30/10 мкг), тетрациклин (TE, 30 мкг), имипенем (IPM, 10 мкг), ципрофлоксацин (CIP, 30 мкг), ампициллин (AMP, 25 мкг) и нитрофурантоин (NIT, 200 мкг).

Чашки с посевами на среде Мюллера—Хинтон инкубировали в течение 24 ч. Зоны ингибирования роста тестируемых культур измеряли через 24 ч. Все работы были выполнены в соответствии с рекомендациями NCCLS документа M2-A11.

Результаты исследования

Из 106 клинических изолятов UPEC 63,2% культур было выделено из образцов мочи девочек и 36,8% — из образцов мочи мальчиков, что соответствует соотношению 1,7:1.

Согласно полученным данным, 49% протестированных изолятов UPEC обладают множественной резистентностью, т. е. были устойчивы к препаратам, относящимся к трём и более группам антибиотиков. 33% изолятов *E.coli* оказались чувст-



Рис. 1. Процентное соотношение резистентных и чувствительных к антибактериальным препаратам уропатогенных *E.coli* в выборке $n=106$.

вительны ко всем протестированным противомикробным препаратам, а 67% были устойчивы, по крайней мере, к одному антибиотику. Из них: 32% культур UPEC были резистентны к антибиотикам более чем из четырёх групп, 17% — из трёх, 10% — из двух и 8% только к антибактериальным препаратам из одной группы (рис. 1).

При оценке устойчивости культур *E.coli* по отношению к антибактериальным препаратам оказалось, что 100% изолятов UPEC чувствительны к фосфомицину (200 мкг). Большинство изолятов продемонстрировали резистентность к амоксилаву (30 мкг) — 69,81% и ампицилину (25 мкг) — 62,26%. Также высокий процент резистентности наблюдался у культур UPEC к цефалоспорином 1-го и 3-го поколения: цефазолин (30 мкг) — 41,5%, цефтиаксон (30 мкг) — 35,84%, цефтазидим (30 мкг) — 29,24%. К комбинированному препарату цефтазидим/клавулановая кислота (30/10 мкг) было резистентно 7,54% культур *E.coli*. Более 30% изолятов оказались резистентны к тетрациклину (30 мкг) и триметаприму (30 мкг) — 32,1% и 37,7%, соответственно.

Особый интерес представляют культуры UPEC, резистентные к имипенему, антибиотику из группы карбапенемов, обладающих широким спектром антибактериального действия. Среди 106 изолятов уропатогенной *E.coli*

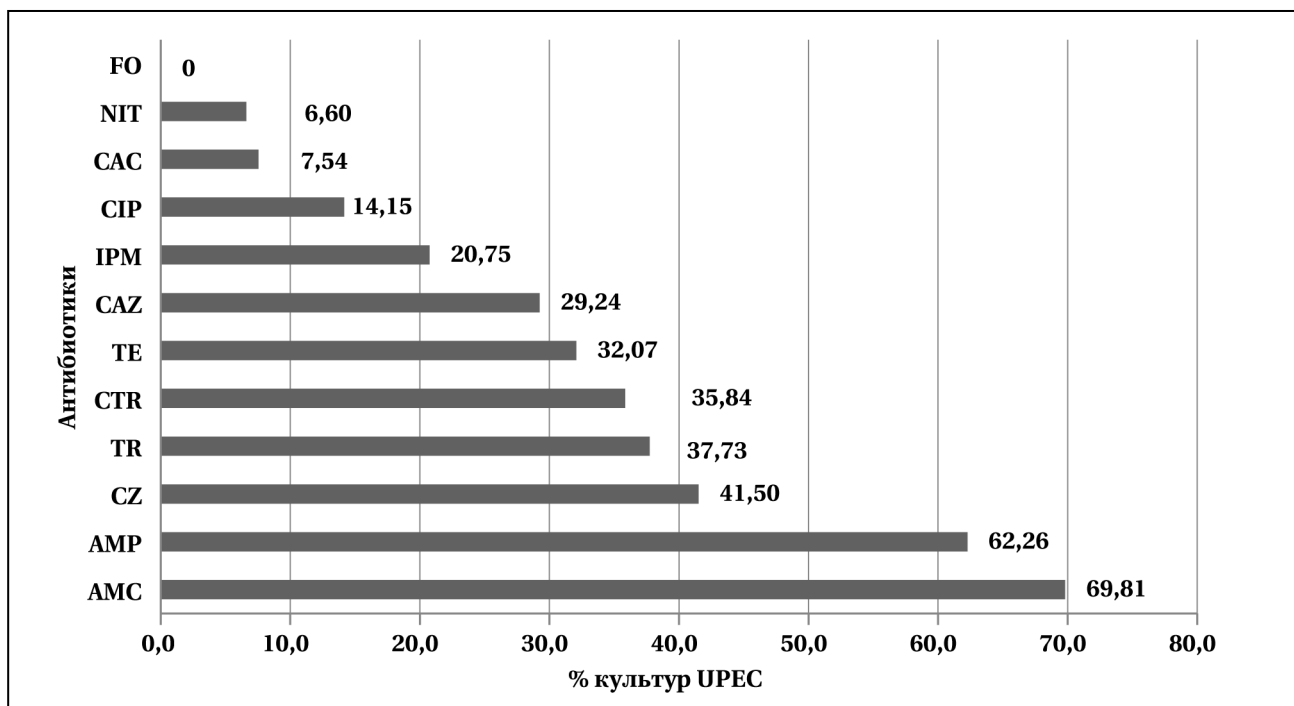


Рис. 2. Процент изолятов в выборке уропатогенных *E.coli* ($n=106$), резистентных к определённому противомикробному препарату.

Примечание. AMC — амоксиклав; AMP — ампициллин; CZ — цефазолин; TR — триметоприм; CTR — цефтриаксон; TE — тетрациклин; CAZ — цефтазидим; IPM — имипенем; CIP — ципрофлоксацин; CAC — цефтазидим с клавулановой кислотой; NIT — нитрофурантоин; FO — фосфомицин.

20,75% оказались резистентными к имипенему. Данные микроорганизмы были выделены от пациентов в возрасте первого года (18%) до двух лет (32%) с диагнозами: врождённый пузырно-мочеточниковый-почечный рефлюкс, врождённая аномалия развития мочевой системы, нейрогенный мочевой пузырь, вторичный пиелонефрит, а также от пациентов 3 лет, 6 лет, 8–10 лет, 14 лет, 16 лет и 18 лет. Имипенеморезистентная группа UPEC ($n=22$) на 50% образована культурами *E.coli*, выделенными от пациентов в возрасте от 1 года до 2 лет, на 45% — культурами, выделенными от пациентов в возрасте от 3 до 18 лет и 5% (1 изолят) от пациента в возрасте 9 мес. (врождённое расширение мочеточников). Несмотря на то что имипенеморезистентные *E.coli* в равной степени выделялись как от пациентов мужского, так и женского пола, в возрастной группе детей двух лет резистентные к имипенему *E.coli* были выделены от мальчиков в 71%, в то время как от девочек в 29% случаев.

Характер резистентности изолятов UPEC к тестируемым антибиотикам показан на рис. 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stamm W.E., Norrby S.R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. J Infect Dis 2001; 183 (Suppl 1): 1–4.
2. Hooton T.M. Uncomplicated urinary tract infection. New Engl J. Med 2012; 366: 1028–1037.

Заключение

Фенотипический анализ спектра антибиотикочувствительности уропатогенных *E.coli* ($n=106$), выделенных от пациентов детского возраста с врождёнными аномалиями развития мочевыводящих путей, свидетельствует о высоком проценте встречаемости полирезистентных штаммов UPEC (49%) и имипенеморезистентных штаммов UPEC (20,75%) среди детей всех возрастных групп. В связи с этим, будущие исследования должны быть направлены на генотипирование резистентных, полирезистентных и имипенеморезистентных штаммов UPEC, что позволит вычленив в популяции уропатогенных *E.coli* клонотипы, обладающие профилями устойчивости к определённым антибактериальным препаратам.

Работа выполнена в рамках инициативной темы № 031620-0-000 «Антибиотикорезистентные клонотипы уропатогенных *Escherichia coli* как мишень для изучения антибактериального действия экстрацеллюлярных продуктов жизнедеятельности бактерий и грибов».

Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

3. Nielubowicz G.R., Mobley H.L. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. Nature Rev Urol 2010; 7: 430–441.
4. Levison M.E., Kaye D. Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant Gram-negative uropathogens Curr Infect Dis Rep 2013; 15: 109–115.

5. *Lichtenberger P., Hooton T.M.* Complicated urinary tract infections. *Curr Infect Dis Rep* 2008; 10: 499–504.
6. *Raeispour M., Ranjbar R.* Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018 Oct; 3(7): 118. doi: 10.1186/s13756-018-0411-4.
7. *Spaulding C.N., Kau A.L., Klein R.D., Janetka J.W., Gordon J.I., Hultgren S.J.* Small-molecule inhibitors against type 1 pili selectively target uropathogenic *E.coli* in the gut and bladder. Published Online 1 Apr 2017 Abstract Number: 939.9
8. *Yun K.W., Kim H.Y., Park H.K., Kim W., Lim I.S.* Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *Microbiol Immunol Infect* 2014; 47 (6): 455–461.
9. *Tarchouna M., Ferjani A., Ben-Selma W., Boukadida J.* Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Infect Dis* 2013; 17 (6): 3.
10. *Lee J.H., Subhadra B., Son Y.J., Kim D.H., Park H.S., Kim J.M. et al.* Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett Appl Microbiol* 2016; 62 (1): 84–90.
11. *Johnson J.R., Kuskowsky M.A., O'Bryan, Maslow J.N.* Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J Infect Dis* 2002; 185: 1439–1447.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Суадкиа С. — ассистент, кафедра микробиологии и вирусологии, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, Москва

Подопригора И. В. — к. м. н., зав.кафедрой микробиологии и вирусологии, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, Москва

Яшина Н. В. — к. б. н., доцент, кафедра микробиологии и вирусологии, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, Москва

Саруханова Л. Е. — к. б. н., доцент, кафедра микробиологии и вирусологии, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, Москва

Кравцов Э. Г. — к. б. н., доцент, кафедра микробиологии и вирусологии, Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, Москва

Практический опыт применения препарата Риамилловир в лечении пациентов с COVID-19 средней степени тяжести

А. У. САБИТОВ¹, В. В. БЕЛОУСОВ¹, А. С. ЕДИН², Е. В. ОЛЕЙНИЧЕНКО³, Е. П. ГЛАДУНОВА⁴,
Е. П. ТИХОНОВА⁵, Т. Ю. КУЗЬМИНА⁵, Ю. С. КАЛИНИНА⁵, *П. В. СОРОКИН⁶

¹ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

² ГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, Москва

³ ФГБУ «Поликлиника №3» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва

⁴ ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара

⁵ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

⁶ ООО «Азол фарма», Новоуральск

Practical Experience of Using Riamilovir in Treatment of Patients with Moderate COVID-19

A. U. SABITOV¹, V. V. BELOUSOV¹, A. S. EDIN², E. V. OLEINICHENKO³, E. P. GLADUNOVA⁴,
E. P. TIKHONOVA⁵, T. YU. KUZMINA⁵, YU. S. KALININA⁵, *P. V. SOROKIN⁶

¹ Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ekaterinburg

² Russian State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow

³ Polyclinic No. 3 of the Administrative Department of the President of the Russian Federation, Moscow

⁴ Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara

⁵ Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky of the Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnoyarsk

⁶ «Azol pharma» LLC, Novouralsk

Дана оценка результатов использования отечественного лекарственного препарата риамилловир при лечении пациентов со среднетяжелой формой заболевания, вызванного новым штаммом вируса SARS-CoV-2. Установлено, что среднее время наступления улучшения состояния пациентов на фоне лечения препаратом составило 6–7 дней. Первый отрицательный результат ПЦР-анализа на вирус SARS-CoV-2 зафиксирован на 10–11 день лечения, два подряд отрицательных результата ПЦР — к 14–19 дням лечения у 63±4,28%. Температура большей части пациентов (75%) нормализовалась к 4-му дню лечения. Отмечено улучшение результатов КТ лёгких пациентов: после прохождения терапии повторный результат КТ, выполненной в среднем на 19-й день от начала терапии, показал отсутствие поражения лёгких у 10±3,0% пациентов либо отсутствие прогрессирования. При проведении КТ лёгких через 1–2 мес. после выписки число пациентов с отсутствием признаков поражения возросло до 27±4,44%. Зафиксировано снижение показателя С-реактивного белка у пациентов в результате лечения. Переносимость препарата оценена как хорошая: не было выявлено нежелательных явлений или значимых отклонений лабораторных показателей.

Ключевые слова: Риамилловир, COVID-19, SARS-CoV-2, противовирусная активность.

The article evaluates the results of Riamilovir use in treatment of patients with a moderate form of the disease caused by a new strain of the SARS-CoV-2 virus. It was found that the average time required to complete resolution of symptoms during treatment with the drug was 6–7 days. The first negative result of PCR analysis for the SARS-CoV-2 virus was registered on the 10–11th day of therapy; two consecutive negative PCR results for the SARS-CoV-2 virus were registered in the majority of patients by day 14–19 of treatment in 63±4.28%. The body temperature of the majority of patients (75%) returned to normal by the 4th day of treatment. CT scan showed improvement in the lungs of patients: a repeated CT scan performed on average on day 19 from the start of therapy showed no lung damage or no progression in 10±3.0% of patients following therapy. The CT scan of the lungs performed in 1–2 months after the treatment showed that the number of patients with no lung damage increased to 27±4.44%. As a result of treatment, a decrease in the C-reactive protein index was observed in patients. The tolerability level of the drug was assessed as good: no adverse events or significant deviations in laboratory parameters were detected.

Keywords: Riamilovir, COVID-19, SARS-CoV-2, antiviral activity.

Введение

Вирусные инфекции — одни из наиболее распространённых инфекционных патологий в мире. Лидирующее положение в общей структуре

занимают острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) [1, 2]. Большую часть заболеваний вызывают такие возбудители, как парамиксовирусы, ортомиксовирусы, пикорнавирусы, аденовирусы и коронавирусы [3].

Семейство коронавирусов, открытое ещё в 1931 г., на данный момент включает 7 видов, способных вызывать заболевания у человека [4]. Из-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: ул. Подгорная, 9. г. Новоуральск, Свердловская обл., 624130

начально считалось, что коронавирусы не представляют особой опасности для человека, однако в 2002 г. в китайской провинции Гуандунь была зарегистрирована эпидемия тяжёлого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом SARS-CoV. Эпидемия распространилась на 29 стран, около 10% пациентов с подтверждённым диагнозом умерли [4, 5]. Вспышка инфекции стала началом изучения и открытия новых видов коронавирусов, в том числе 2 вирусов, вызывающих заболевания человека — NL63 и HKU1 [4].

В 2014 г. произошла вспышка Ближневосточного респираторного синдрома (вызванного вирусом типа MERS-CoV) [4]. Около 2,5 тыс. случаев заболевания были зафиксированы в 23 странах, при этом вспышки от единичных до нескольких десятков случаев продолжают фиксироваться [4, 6].

В 2019 г. мир столкнулся с новой эпидемией коронавирусной инфекции, получившей статус пандемии [7]. Вспышка заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, вирусом острого респираторного синдрома 2-го типа, на данный момент зафиксирована более чем в 118 странах [4, 7, 8].

На фоне распространения коронавирусной инфекции идёт активный поиск и разработка противовирусных химиопрепаратов, гарантирующих эффективность этиотропной терапии [2].

Одним из препаратов, проявляющих прямую противовирусную активность в отношении РНК-содержащих вирусов, является риамилловир («Триазавирин®»), зарегистрированный в Российской Федерации с 2014 г. в качестве лекарственного средства для лечения гриппа. Однако в целом ряде клинических исследований была доказана эффективность и безопасность препарата не только для пациентов с диагнозом грипп, но и с ОРВИ негриппозной этиологии [9–13]. В связи с вышесказанным, на наш взгляд, целесообразным является изучение активности и безопасности препарата риамилловир в лечении инфекции, вызванной новым видом коронавируса.

Материал и методы

Проведено открытое когортное исследование клинической эффективности и безопасности применения противовирусного препарата риамилловир («Триазавирин®») у пациентов старше 18 лет с подтверждённым диагнозом COVID-19 средней степени тяжести. Лечение и наблюдение пациентов проводилось на базе ФГБУ «Поликлиника №3» Управления делами Президента Российской Федерации (Москва), муниципального автономного учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница №40» (Екатеринбург), КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н. С. Карповича» (Красноярск). Оценка тяжести проводилась на основании критериев, изло-

женных во временных рекомендациях Министерства здравоохранения Российской Федерации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции Covid-19».

Лабораторная верификация диагноза проводилась методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) мазков из носоглотки.

Пациенты получали препарат риамилловир (Триазавирин®, производитель ООО «Завод Медсинтез», Россия) в дозировке 250 мг/ 3 раза в день в качестве противовирусной монотерапии. Длительность курса составила 10 дней. Назначение препарата осуществлялось в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации №441 «Об особенностях обращения лекарственных препаратов для медицинского применения, которые предназначены для применения в условиях угрозы возникновения, возникновения и ликвидации чрезвычайной ситуации и для организации оказания медицинской помощи лицам, пострадавшим в результате чрезвычайных ситуаций, предупреждения чрезвычайных ситуаций, профилактики и лечения заболеваний, представляющих опасность для окружающих, заболеваний и поражений, полученных в результате воздействия неблагоприятных химических, биологических, радиационных факторов». Параллельно пациенту назначалась патогенетическая и симптоматическая терапия. Измерение температуры тела пациентов проводили ежедневно. Основные контрольные точки для оценки динамики температуры тела определены на 3- и 7-й дни наблюдения. Отдельно фиксировался день терапии, на который температура тела достигала уровня нормализации.

Для оценки эффективности и безопасности лечения использовались следующие параметры: количество дней до получения двух подряд отрицательных результатов ПЦР-анализа; количество дней до улучшения состояния пациента (на основании отсутствия жалоб); количество дней до нормализации температуры тела (под нормализацией температуры тела понимается значение температуры <37°C); количество дней до улучшения результатов компьютерной томографии (КТ) лёгких пациентов; изменение результатов анализа на С-реактивный белок; переносимость препарата.

Результаты и обсуждение

В исследование методом случайной выборки было включено 214 пациентов со среднетяжёлой формой заболевания, подтверждённого методом ПЦР, с диагнозом COVID-19. Средний возраст $52,69 \pm 1,29$ ДИ [50,13–55,25] лет (табл. 1).

Большая часть пациентов ($67 \pm 4,7\%$) не имела сопутствующих заболеваний, при этом для оставшейся части пациентов были зафиксированы следующие сопутствующие заболевания:

- заболевания органов дыхания (хроническая обструктивная болезнь лёгких, бронхиальная астма — $11 \pm 3,13\%$);
- заболевания эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (сахарный диабет и ожирение — $17 \pm 3,76\%$);
- заболевания органов дыхания и заболевания эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ одновременно ($5 \pm 2,18\%$).

Таблица 1. Возрастные данные пациентов, включённых в исследование

Возрастной диапазон, лет	%	Средний возраст
От 18 до 35	$7 \pm 2,55$	$28,7 \pm 28,7$ ДИ [23,77–33,66]
От 35 до 55	$50 \pm 5,00$	$45,9 \pm 0,83$ ДИ [44,30–47,54]
От 55	$43 \pm 4,95$	$64,5 \pm 1,16$ ДИ [62,14–66,79]

Таблица 2. Сравнительный анализ поражения лёгких по результатам КТ — при поступлении, повторной КТ после терапии и КТ через 1–2 мес. после выписки пациента

Поражение лёгких	КТ при поступлении, %	Повторное КТ, %	Проверка гипотезы о значимости различий	КТ через 1–2 мес., %	Критерий Пирсона (χ^2 , p)
Нет поражения лёгких	0	10	Точный критерий Фишера $p=0,0008$	27	$\chi^2=9,58$, $p=0,002$
До 25%	29	22	Критерий Пирсона $\chi^2=1,29$, $p=0,2561$	54	$\chi^2=21,73$, $p=0,00001$
25–50%	69	67	Критерий Пирсона $\chi^2=0,09$, $p=0,7618$	19	$\chi^2=47,0$, $p=0,00001$
Более 50%	2	1	Точный критерий Фишера $p=0,5$	0	Точный критерий Фишера $p=0,5$

К концу первой недели лечения (6–7 день) улучшение общего состояния отмечено у 57±4,95% пациентов. При этом согласно некоторым исследованиям, состояние пациентов, не принимавших специфическую противовирусную терапию, в среднем улучшалось только к третьей–четвертой неделе терапии [14–16].

Первый отрицательный результат (ПЦР-анализ) на вирус SARS-CoV-2 у большинства пациентов был получен до 13 дня лечения (улучшение составило 59±4,92%, точный критерий Фишера $p=0,00001$, по сравнению с первым результатом ПЦР). Наибольшее число пациентов с первым отрицательным результатом ПЦР было на 10-й (42,37±3,8% пациентов) и 11-й (35,59±3,68% пациентов) дни наблюдения.

В процессе проведения исследования установлено, что два подряд отрицательных результата ПЦР на вирус SARS-CoV-2 было зарегистрировано у большинства пациентов (63±4,28%) к 14–19 дням лечения.

Динамика температурной реакции с учётом контрольных точек была следующей: при поступлении 100% пациентов имели температуру тела выше нормы, на третий день терапии 18±3,84% пациентов имели нормальную температуру тела (точный критерий Фишера $p=0,00001$), а на 7-й день терапии температура нормализовалась у 100% пациентов (точный критерий Фишера $p=0,00001$). При этом у 75±4,33% пациентов температура нормализовалась к 4-му дню лечения.

В ходе наблюдения отмечено улучшение результатов КТ лёгких пациентов. При поступлении 69±4,63% пациентов имели поражения лёгких от 25 до 50%, 29,0±4,54% пациентов имели поражения лёгких до 25% и 2,0±1,4% пациентов имели степень поражения лёгких свыше 50%. Пациентов без поражения лёгких не было.

После прохождения терапии повторный результат КТ (выполненной в среднем на 19-й день от начала терапии) показал, что у 10±3,0% пациентов не было поражения лёгких ($p=0,0008$). Третий результат КТ (через 1–2 мес. после выписки пациента) показал, что число пациентов с отсутствием поражения лёгких возросло до 27±4,44% ($\chi^2=9,58$, $p=0,002$) (табл. 2).

При этом в отдельных зарубежных исследованиях показано, что при отсутствии специфической терапии, состояние пациентов может ухудшаться [17].

Результат анализа С-реактивного белка у пациентов на начало исследования был менее 10 мг/л у 33±4,7% пациентов, более 10 мг/л — у 67±4,7% пациентов.

В результате терапии на 14-й день наблюдения у большинства пациентов (90±3,0%, $\chi^2=68,61$ $p=0,00001$) уровень С-реактивного белка был менее 10 мг/л. При этом в исследованиях, где пациенты не применяли специфическую противовирусную терапию, число пациентов с показателем за пределами нормы в течение времени терапии росло [17].

В ходе наблюдения не было выявлено каких-либо нежелательных явлений, проявляющихся клинически или значимыми отклонениями лабораторных показателей, что свидетельствует о хорошей переносимости препарата. Отсутствие возникновения нежелательных явлений сравнимо с данными о количестве нежелательных явлений у пациентов, не получавших специфическую противовирусную терапию, при других проведённых исследованиях [14, 17, 18].

Обсуждение исследования

В ходе наблюдения за пациентами со среднетяжёлой формой Covid-19, в лечении которых в качестве этиотропной противовирусной монотерапии использован препарат риамилловир, эмпирическим путём были получены результаты, обнадеживающие в плане продолжения исследований по оценке эффективности указанного препарата в терапии новой коронавирусной инфекции. Подавлением вирусной активности можно объяснить полученный клинический эффект в виде сроков исчезновения общих симптомов, включая купирование лихорадки, и лабораторных признаков системного воспаления, отсутствие прогрессирования и обратное развитие пневмонии, по данным КТ, наконец, отрицательные результаты ПЦР на 10-, 11-, 14-й дни болезни. При этом в ранее проведённых зарубежных исследованиях показано, что отрицательный результат ПЦР-анализа у пациентов был получен к 23-му дню наблюдения [14].

Выводы

1. Получены клинические, лабораторные, рентгенологические данные о эффективности противовирусного препарата риамилон в лечении новой коронавирусной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Сологуб Т.В., Токин И.И., Мидикари А.С., Цветкова В.В. Сравнительная эффективность и безопасность применения противовирусных препаратов в терапии больных гриппом. *Инфекционные болезни*. — 2017. — Т. 15. — №3. — С. 25–32. / Sologub T.V., Tokin I.I., Midikari A.S., Tsvetkov V.V. A comparative efficacy and safety of using antiviral drugs in therapy of patients with influenza. *Infectious Diseases*. 2017; 15 (4): 25–32. [in Russian] doi: 10.20953/1729-9225-2017-3-25-32
2. Калужин О.В. Острые респираторные вирусные инфекции: современные вызовы, новый взгляд на место индукторов интерферонов в профилактике и терапии. *Лечащий врач*. — 2013. — № 9. — С. 1–6. / Kalyuzhin O.V. Ostrye respiratornye virusnye infekcii: sovremennyye vyzovy, novyy vzglyad na mesto induktorov interferonov v profilaktike i terapii. *Lechashchij Vrach* 2013; 9: 1–6. [in Russian]
3. Pyrc K., Berkhout B., van der Hoek L. Identification of new human coronaviruses. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2007; 5 (2): 245–253. doi:10.1586/14787210.5.2.245
4. Шелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). *Инфекция и иммунитет*. — 2020. — Т. 10. — №2. — С. 221–246. / Shchelkanov M.Yu., Popova A.Yu., Dedkov V.G., Akimkin V.G., Maleev V.V. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). *Russian Journal of Infection and Immunity* 2020; 10 (2): 221–246. [in Russian] doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-HOI-1412>
5. Pitsou G.G., Kioumis I.P. Severe acute respiratory syndrome (SARS). [Internet] *BMJ Best Practices*; 2020 [cited 2020 Aug 7]. Available from: <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/904/>
6. Distribution of confirmed cases of MERS-CoV by place of infection and month of onset, from March 2012 to 2 December 2019. 2019 Dec 6 [cited 2020 Aug 7]. In: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) [Internet]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/distribution-confirmed-cases-mers-cov-place-infection-and-month-onset-march-2012>
7. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. 2020 Mar 11 [cited 2020 Aug 7]. In: World Health Organization [Internet]. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
8. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering at Johns Hopkins University [dashboard]. ArcGIS.Johns Hopkins University. August 7, 2020. Available at: <https://www.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>. Accessed August 7, 2020.
9. Тихонова Е.П., Кузьмина Т.Ю., Андреева Н.В., Тюшевская О.А., Елистратова Т.А., Кузьмин А.Е. Изучение эффективности противовирусных препаратов (умифеновира, триазавирина) в отношении

острых респираторных вирусных инфекций. *Казанский медицинский журнал*. — 2018. — Т. 99, — № 2. — С. 215–223. / Tikhonova, E. P., Kuz'mina, T. Y., Andronova, N. V., Tyushevskaya, O. A., Elistratova, T. A., Kuz'min A. E. Study of effectiveness of antiviral drugs (umifenovir, triazavirin) against acute respiratory viral infections. *Kazan Medical Journal* 2018; 99 (2): 215–223. [In Russian]. doi: 10.17816/KMJ2018-215

2. Отсутствие нежелательных явлений в процессе лечения препаратом риамилон больных с Covid-19 свидетельствуют о его хорошей переносимости.

10. Киселев О.И., Деева Э.Г., Мельникова Т.И., Козелецкая К.Н., Киселев А.С., Русинов В.Л. и др. Новый противовирусный препарат Триазавирин. Результаты II фазы клинического исследования. *Вопросы вирусологии*. — 2012. — Т. 57. — №6. — С. 9–12. / Kiselev O.I., Deyeva E.G., Melnicova T.I., Kozeleckaia K.N., Kiselev A.S., Rusinov V.L. et al. A new antiviral drug triazavirin: results of phase II clinical trial. *Problems of Virology* 2012; 57 (6): 9–12. [in Russian]
11. Веревищников В.К., Шемякина Е.К., Сабитов А.У., Бацкалевич Н.А. Современная этиотропная терапия гриппа и ОРВИ у взрослых больных с отягощённой преморбидной патологией. *Антибиотики и химиотерапия*. — 2018. — Т. 63. — № 7–8. / Verevshchikov V. K., Shemyakina E. K., Sabitov A. U., Batskalevich N. A. Modern Etiotropic Therapy of Influenza and ARVI in Adult Patients with Premorbid Pathology. *Antibiotiki i Khimioter* 2018; 63: 7–8. [in Russian]
12. Токин И.И., Зубкова Т.Г., Дроздова Ю.В., Лиознов Д.А. Опыт этиотропной терапии ОРВИ отечественным противовирусным препаратом. *Инфекционные болезни*. — 2019. — Т. 17. — №4. — С. 13–17. / Tokin I.I., Zubkova T.G., Drozdova Y.V., Lioznov D.A. Experience of etiotropic therapy of acute respiratory viral infection with domestic antiviral drug. *Infectious Diseases* 2019; 17 (4): 13–17. [in Russian]. doi: 10.20953/1729-9225-2019-4-13-1
13. Касьяненко К.В., Львов Н.И., Мальцев О.В., Жданов К.В. Нуклеозидные аналоги в терапии гриппа: история и опыт. *Журнал Инфектологии*. — 2019. — Т. 11. — № 3 / Kasianenko K.V., Lvov N.I., Maltsev O.V., Zhdanov K.V. Nucleoside analogues for the treatment of influenza: history and experience. *Journal Infekologii* 2019; 11: 3. [in Russian]
14. Tang W., Cao Z., Han M. et al. Hydroxychloroquine in patients with mainly mild to moderate coronavirus disease 2019: open label, randomised controlled trial. *BMJ* 2020; 369: m1849. doi:10.1136/bmj.m1849
15. Mitjà O., Corbacho-Monné M., Ubals M. et al. Hydroxychloroquine for Early Treatment of Adults with Mild Covid-19: A Randomized-Controlled Trial. *Clin Infect Dis* 2020; ciaa1009. doi:10.1093/cid/ciaa1009
16. Skipper C.P., Pastick K.A., Engen N.W. et al. Hydroxychloroquine in Nonhospitalized Adults With Early COVID-19: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2020; M20-4207. doi:10.7326/M20-4207
17. Ye X.T., Luo Y.L., Xia S.C. et al. Clinical efficacy of lopinavir/ritonavir in the treatment of Coronavirus disease 2019. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24 (6): 3390–3396. doi:10.26355/eurrev_202003_20706
18. Li Y., Xie Z., Lin W., Zhang F., Deng X., Li L. et al. Efficacy and safety of lopinavir/ritonavir or arbidol in adult patients with mild/moderate COVID-19: an exploratory randomized controlled trial. *Cellpress*. 2020. doi: 10.1016/j.medj.2020.04.001

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сабитов Алейбай Усманович — д. м. н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

Белосудов Виталий Витальевич — ассистент кафедры инфекционных болезней и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, заведующий инфекционным отделением №1 МАУ Городская клиническая больница № 40, Екатеринбург

Един Антон Сергеевич — к. м. н., зам. начальника отдела экспертизы биомедицинских технологий и координации клинических исследований Центра биомедицинских технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Олейниченко Екатерина Викторовна — к. м. н., врач-пульмонолог ФГБУ «Поликлиника №3» Управления делами Президента РФ, Москва

Гладунова Елена Павловна — д. фарм. н., профессор кафедры управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара

Тихонова Елена Петровна — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

Кузьмина Татьяна Юрьевна — к. м. н., доцент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

Калинина Юлия Сергеевна — ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

Сорокин Павел Владимирович — к. фарм. н., ген. директор ООО «Азол Фарма», Новоуральск

Влияние типа ацетилирования на частоту гепатотоксичности изониазида у пациентов с впервые выявленным туберкулёзом органов дыхания

*Н. М. КРАСНОВА¹, Н. Е. ЕВДОКИМОВА², А. А. ЕГОРОВА², О. И. ФИЛИППОВА², Е. А. АЛЕКСЕЕВА³,
З. А. РУДЫХ³, Я. В. ЧЕРТОВСКИХ³, А. И. ВЕНГЕРОВСКИЙ⁴, А. Ф. КРАВЧЕНКО², Д. А. СЫЧЕВ⁵

¹ Медицинский институт «Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова», Якутск

² Научно-практический центр «Фтизиатрия», Якутск

³ Республиканская клиническая больница № 3, Якутск

⁴ Сибирский государственный медицинский университет, Томск

⁵ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва

Influence of the Acetylation Type on the Incidence of Isoniazid-Induced Hepatotoxicity in Patients with Newly Diagnosed Pulmonary Tuberculosis

*N. M. KRASNOVA¹, N. E. EVDOKIMOVA², A. A. EGOROVA², O. I. FILIPPOVA², E. A. ALEKSEEVA³,
Z. A. RUDYKH³, YA. V. CHERTOVSKYKH³, A. I. VENGEROVSKII⁴, A. F. KRAVCHENKO², D. A. SYCHEV⁵

¹ M. K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk

² Phthisiatry Research-Practice Center, Yakutsk

³ Republican Hospital no. 3, Yakutsk

⁴ Siberian State Medical University, Tomsk

⁵ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow

Обоснование: опасной нежелательной побочной реакцией изониазида является повреждение печени. Индивидуальная восприимчивость человека к действию изониазида обусловлена присутствием в геноме аллельных вариантов гена фермента N-ацетилтрансферазы 2. Актуально оценить влияние генетически детерминированной скорости ацетилирования изониазида на риск развития его гепатотоксического действия с целью прогнозирования и профилактики поражения печени и повышения безопасности химиотерапии туберкулёза. **Цель** — изучить влияние типа ацетилирования на частоту гепатотоксичности изониазида у пациентов с впервые выявленным туберкулёзом органов дыхания, проживающих в Республике Саха (Якутия). **Материал и методы.** В исследование включены 112 пациентов с впервые выявленным туберкулёзом органов дыхания. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, исследован ряд однонуклеотидных полиморфизмов rs1801280, rs1799930, rs1799931, rs1799929, rs1208, rs1041983. Гепатотоксичность определяли по результатам клинко-лабораторного мониторинга с использованием критериев, разработанных экспертами Европейской ассоциации по изучению печени (2019). **Результаты.** Гепатотоксические реакции чаще развивались у медленных ацетиляторов (43,2%), по сравнению с быстрыми (20,7%) и промежуточными (10,9%); $p=0,002$. Активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови возрастала в 5 и более раз выше верхней границы нормы у 37,8% медленных ацетиляторов и у 8,7% промежуточных; $p=0,001$. Клинические проявления гепатотоксичности изониазида регистрировали чаще у медленных ацетиляторов (29,7%), чем у быстрых (3,4%); $p=0,000$. **Выводы.** Медленный тип ацетилирования следует считать важным фактором риска развития гепатотоксичности изониазида у пациентов с туберкулёзом органов дыхания.

Ключевые слова: туберкулёз; изониазид; N-ацетилтрансфераза 2; тип ацетилирования; гепатотоксичность.

Introduction. Liver damage can be a dangerous side effect of using isoniazid. Individual susceptibility to isoniazid in humans is dependent on the presence of N-acetyltransferase 2 allelic variants in genome. It was imperative to assess the effect of genetically determined isoniazid acetylation rate in terms of risk of developing isoniazid-induced hepatotoxicity, as well as prevention of potential hepatopathy, and improvement of tuberculosis chemotherapy safety. **Aim.** To study the effect of acetylation type on the incidence of isoniazid hepatotoxicity in residents of the Sakha Republic (Yakutia) with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. **Methods.** The study included 112 patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. Genotyping was performed using real-time polymerase chain reaction. The following single nucleotide polymorphisms were studied: rs1801280, rs1799930, rs1799931, rs1799929, rs1208, rs1041983. Hepatotoxicity was determined based on the results of clinical laboratory monitoring and using the criteria developed by the European Association for the Study of the Liver (2019). **Results.** Hepatotoxic reactions developed more often in slow acetylators (43.2%), compared to fast acetylators (20.7%) and intermediate acetylators (10.9%); $p=0.002$. Serum alanine aminotransferase activity was 5 or more times above the upper limit of normal activity in 37.8% of slow acetylators, and in 8.7% of intermediate acetylators; $p=0.001$. Clinical manifestations of isoniazid hepatotoxicity were observed more often in slow acetylators (29.7%), than in fast acetylators (3.4%); $p=0.000$. **Conclusion.** Slow acetylation type ought to be considered an important risk factor for developing isoniazid hepatotoxicity in patients with pulmonary tuberculosis.

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: ул. Белинского, д. 58, Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова, г. Якутск, Республика Саха (Якутия). E-mail: krasnova14@mail.ru

Keywords: tuberculosis; isoniazid; N-acetyltransferase 2; acetylation types; hepatotoxicity.

Введение

В последние годы в Республике Саха (Якутия) уменьшились заболеваемость и смертность от туберкулёза. В 2019 г. заболеваемость туберкулёзом в Якутии составила 50,3, смертность от туберкулёза — 3,9 случая на 100 000 населения (по ф.№8, с учётом ведомств) (Кондратьева О. Д. и соавт., 2020). В регионе среди пациентов с впервые выявленным туберкулёзом преобладающей формой заболевания остаётся туберкулёз органов дыхания (99,2% от общего числа пациентов с туберкулёзом). Проблема повышения эффективности и безопасности его лечения остаётся актуальной.

С 1952 г. и по настоящее время изониазид является эффективным химиотерапевтическим средством первой линии для лечения лекарственно-чувствительного туберкулёза. Применение изониазида сопряжено с развитием таких нежелательных побочных реакций, как нейротоксичность, гепатотоксичность, угнетение кроветворения [1]. Гепатотоксические реакции становятся ведущей причиной отмены изониазида, что значительно уменьшает эффективность противотуберкулёзной терапии, повышает риск рецидива заболевания и формирует вторичную лекарственную устойчивость микобактерий туберкулёза [2, 3].

Частота гепатотоксических реакций изониазида у пациентов с туберкулёзом вариабельна и составляет от 1 до 36% [1]. Основной вред организму наносят высокоактивные промежуточные метаболиты изониазида — гидразин и ацетилгидразин [4, 5].

Основные пути метаболизма изониазида включают ацетилирование с образованием N-ацетилизониазида в реакции, катализируемой N-ацетилтрансферазой 2 (NAT2), а также гидролиз амидазой с образованием изоникотиновой кислоты и гидразина. На следующем этапе биотрансформации N-ацетилизониазид гидролизуеться амидазой до изоникотиновой кислоты и токсического метаболита ацетилгидразина. Ацетилгидразин под действием фермента NAT2 ацетируется в нетоксичный диацетилгидразин [3, 4, 6, 7], но может превращаться в гидразин. Образование гидразина более активно происходит у пациентов с генотипом медленного ацетилирования [8]. Часть молекул ацетилгидразина окисляется при участии изофермента CYP2E1 цитохрома P450 в гепатотоксические метаболиты ацетилдаизен, кетен и ион ацетилоний [9]. Таким образом, NAT2 участвует в трёх важных этапах биотрансформации изониазида и его метаболитов: дезактивации (образовании ацетилизониазида), биоактивации (образовании ацетилгидразина) и детоксикации (образование диацетилгидразина) [5]. Следовательно, активность NAT2 определяет интенсивность метаболизма изониазида и риск появления потенциально ге-

патотоксических продуктов биотрансформации изониазида — гидразина и ацетилгидразина.

Генетические особенности биотрансформации лекарственных средств рассматриваются в качестве важной причины идиосинкразического повреждения печени [10]. Полиморфизм гена NAT2 идентифицирован как фактор риска гепатотоксичности изониазида [1, 11–13].

Вариабельность активности фермента NAT2 является результатом однонуклеотидных замен (single nucleotide polymorphism, SNP) в структурной области кодирующего гена [14]. Нуклеотидные замены в гене NAT2 могут модифицировать белковую структуру фермента, уменьшать его синтез и изменять активность [15]. В зависимости от генетически детерминированной скорости ацетилирования выделяют три типа ацетиляторов: быстрый, промежуточный и медленный [16, 17].

В метаанализах и систематических обзорах установлена взаимосвязь между типом ацетилирования и частотой развития гепатотоксических реакций при приёме изониазида [1, 12, 13, 18, 19]. Быстрые ацетиляторы метаболизируют изониазид в 5–6 раз быстрее, чем медленные. У медленных ацетиляторов определяются более высокие концентрации в плазме изониазида и его метаболитов по сравнению с концентрациями у быстрых ацетиляторов [3, 5, 18]. Константа скорости ацетилирования ацетилгидразина при приёме изониазида внутрь у быстрых ацетиляторов в 4 раза больше, чем у медленных ацетиляторов [9]. Результаты генотипирования по полиморфизму гена NAT2 позволяют проводить коррекцию дозы изониазида для персонализированного лечения туберкулёза. Таким образом, в связи с вариабельностью скорости ацетилирования изониазида определение типа ацетилирования имеет важное клиническое значение для повышения эффективности и безопасности лечения пациентов с туберкулёзом органов дыхания.

Влияние скорости ацетилирования изониазида на риск развития гепатотоксических реакций у пациентов, проживающих на территории Республики Саха (Якутия), не изучено.

Цель исследования — изучить влияние типа ацетилирования на частоту гепатотоксичности изониазида у пациентов с впервые выявленным туберкулёзом органов дыхания, проживающих в Республике Саха (Якутия).

Материал и методы

Ретроспективное сравнительное одноцентровое когортное исследование проведено на базе Государственного бюджетного учреждения Республики Саха (Якутия) «Научно-практический центр «Фтизиатрия», Якутск (далее ГБУ РС(Я) НПЦ «Фтизиатрия»). Протокол исследования рассмотрен и одобрен этическим комитетом при ГБУ РС(Я) НПЦ «Фтизиатрия», протокол № 3 от 26.09.2018 г.

В исследовании участвовали 112 пациентов с впервые выявленным туберкулёзом органов дыхания, госпитализированных в терапевтическое отделение в период с ноября 2018 г. по

декабрь 2019 г. Среди них были 49 (43,8%) женщин и 63 (56,2%) мужчин в возрасте от 18 до 83 лет (средний возраст 35,5 [27,0; 50,7] лет). Масса тела пациентов — 56,9 [50,1; 66,7] кг. Якуты составляли 79,5% (89 пациентов), русские — 20,5% (23). Критерии включения: 1) впервые в жизни выявленный туберкулёз органов дыхания; 2) возраст 18 лет и старше; 3) интенсивная фаза противотуберкулёзной химиотерапии с обязательным включением изониазида; 4) наличие подписанного информированного согласия пациента. Критерии исключения: генерализованный туберкулёз, ВИЧ-инфекция, наличие злокачественных новообразований, беременность, длительность интенсивной фазы менее 60 дней.

В соответствии с клиническими рекомендациями «Туберкулёз органов дыхания у взрослых» (2018), утверждёнными Минздравом России, и инструкцией по применению противотуберкулёзных препаратов все пациенты в интенсивной фазе лечения туберкулёза получали изониазид в дозе 5–10 мг/кг/сут (не более 600 мг/сут); этамбутол в дозе 15–25 мг/кг/сут (не более 2000 мг/сут); рифампицин в дозе 10 мг/кг/сут (не более 600 мг/сут); пипразинамид в дозе 25–30 мг/кг/сут (более 2500 мг/сут).

Переносимость лечения оценивали ежедневно по клиническим симптомам и 1 раз в месяц или чаще по данным общего и биохимического анализа крови. Гепатотоксичность изониазида характеризовали на основании результатов клинико-лабораторного мониторинга с использованием критериев, разработанных экспертами Европейской ассоциации по изучению печени (EASL) и опубликованных в клинических рекомендациях EASL (2019): а) рост в сыворотке крови активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) в 5 и более раз выше верхней границы нормы независимо от наличия симптомов патологии печени и уровня билирубина; б) повышение в сыворотке крови активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в 2 и более раз выше верхней границы нормы, особенно в сочетании с повышением активности γ -глутамилтранспептидазы; в) повышение в сыворотке крови активности АЛТ в 3 и более раз выше верхней границы нормы при наличии симптомов гепатита (анорексии, тошноты, слабости, желтухи, боли в правом подреберье) и/или в сочетании с повышением уровня общего билирубина в 2 и более раз выше верхней границы нормы [20]. Если у пациентов до начала лечения были повышены активность ферментов и содержание билирубина, за норму принимали их средние значения. В каждом случае исключались другие (нелекарственные) причины поражения печени.

Активность АЛТ, ЩФ, γ -глутамилтранспептидазы, содержание общего билирубина в сыворотке крови определяли на автоматическом биохимическом анализаторе XL-640 (Erba Lachema, Чехия) с помощью реагентов XL System Pack® (ERBA Mannheim, Чехия). У всех пациентов утром натощак из локтевой вены забирали 8–9 мл крови в вакуумные пробирки без наполнителя (Zhejiang Gongdong Medical Technology Co., Ltd, Китай).

Для генотипирования из цельной крови выделяли ДНК с помощью наборов реагентов ExtractDNA Blood (ЗАО «Евроген», Россия). Носительство полиморфных вариантов NAT2*5 (rs1801280, T341C), NAT2*6 (rs1799930, G590A), NAT2*7 (rs1799931, G857A), NAT2*11 (rs1799929, C481T), NAT2*12 (rs1208, A803G), NAT2*13 (rs1041983, C282T) определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad, США) с помощью набора реагентов «ГенТест-М NAT2» (ООО «НОМОТЕК», Россия).

Для генетического исследования осуществляли забор 3–4 мл крови из вены локтевого сгиба в вакуумные пробирки с помощью закрытой вакуумной системы (Zhejiang Gongdong Medical Technology Co., Ltd, Китай). Пробирки имели мелкодисперсное напыление K3 этилендиаминтетрауксусной кислоты. Генетически детерминированную скорость метаболизма рассчитывали с помощью онлайн-калькулятора NATpred с учётом 6 SNP в гене NAT (http://nat2pred.rit.albany.edu/help.html#batch) [21]. Распределение генотипов полиморфных вариантов гена NAT2 соответствовало закону Харди–Вайнберга ($p > 0,005$).

Статистический анализ данных проводили в пакете IBM SPSS STATISTICS 22. Соответствие распределения количественных переменных нормальному закону оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка. В связи с тем, что распределение анализируемых количественных переменных отличалось от нормального, данные представлены в виде медианы (*Me*) и межквартильного (25 и 75%) распределения в формате *Me* (Q1; Q3). При сравнении групп в зависимости от типа данных и количества групп использовали критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, Пирсона χ^2 . Критическое значение уровня статистической значимости различий (*p*) принималось равным 0,05.

Результаты и обсуждение

У пациентов с впервые выявленным туберкулёзом органов дыхания, включённых в исследование, преобладал инфильтративный туберкулёз лёгких (54/112, 48,2%), реже диагностировали диссеминированный (30/112, 26,8%) и очаговый туберкулёз лёгких (28/112, 25,0%). При рентгенологическом исследовании у 39/112 (34,8%) пациентов выявляли двустороннее поражение лёгочной ткани, у 73/112 (65,2%) — одностороннее поражение, у 50/73 (68,5%) — ограниченное в пределах 1–2 сегментов поражение. У 34/112 (30,4%) пациентов диагностировали фазу распада. Выделение микобактерий туберкулёза установлено у 75/112 (67,0%) пациентов.

Для лечения туберкулёза органов дыхания применяли изониазид в суточной дозе 600,0 [450,0; 600,0] мг; рифампицин в дозе 600,0 [450,0; 600,0] мг/сут; пипразинамид в дозе 1500,0 [1250,0; 1625,0] мг/сут; этамбутол в дозе 1200,0 [1000,0; 1300,0] мг/сут. В интенсивной фазе лечения больные получали 88,0 [64,0; 100,7] доз противотуберкулёзных средств. Длительность стационарного лечения была 98,0 [74,5; 126,0] койко-дней.

На стационарном этапе интенсивной фазы лечения туберкулёза органов дыхания гепатотоксичность диагностировали у 27/112 (24,1%) пациентов после приёма 24,0 [7,0; 50,0] доз противотуберкулёзных средств. Активность АЛТ в сыворотке крови становилась в 5 и более раз выше верхней границы нормы у 24/27 (88,9%) пациентов после приёма 22,0 [6,0; 50,0] доз препаратов. Клинические проявления гепатотоксичности (выраженная слабость, анорексия, тошнота, рвота, боль в правом подреберье) выявляли у 12/27 (44,4%) пациентов. При развитии поражения печени на фоне лечения туберкулёза у 17/27 (63,0%) пациентов приходилось отменять как минимум одно противотуберкулёзное средство, 23/27 (85,2%) пациентам проводили дезинтоксикационную и гепатопротективную фармакотерапию. Все пациенты, включённые в исследование, закончили интенсивную фазу лечения туберкулёза органов дыхания.

После проведения фармакогенетического исследования и определения типа ацетилирования были выделены 3 подгруппы пациентов: 1-я груп-

па — 29/112 (25,9%) быстрых ацетиляторов, 2-я группа — 46/112 (41,1%) промежуточных ацетиляторов, 3-я группа — 37/112 (33,0%) медленных ацетиляторов.

С помощью статистического критерия χ^2 Пирсона была выявлена значимая разница частоты и времени развития гепатотоксических реакций в зависимости от типов ацетилирования изониазида. Гепатотоксические реакции развивались у 16/37 (43,2%) медленных ацетиляторов, у 6/29 (20,7%) быстрых и у 5/46 (10,9%) пациентов с промежуточным типом ацетилирования; $p=0,002$. У медленных ацетиляторов гепатотоксические реакции возникали после приёма 16,0 [5,0; 38,5] доз противотуберкулёзных средств, у быстрых ацетиляторов — после приёма 55,0 [44,7; 66,2] доз, у промежуточных — после приёма 20,0 [17; 30,5] доз; $p=0,020$. По данным парного сравнения с использованием критерия Манна–Уитни, дозы противотуберкулёзных средств, после приёма которых развилась гепатотоксичность, значительно отличались у быстрых и промежуточных ацетиляторов ($p=0,006$), у быстрых и медленных ацетиляторов ($p=0,016$).

Рост в сыворотке крови активности АЛТ в 5 и более раз выше верхней границы нормы регистрировали у 14/37 (37,8%) пациентов с медленным типом ацетилирования изониазида, у 4/46 (8,7%) с промежуточным типом; $p=0,001$. У быстрых ацетиляторов активность АЛТ повышалась у 6/29 (20,7%) пациентов.

Клинические проявления гепатотоксичности диагностировали у 11/37 (29,7%) медленных ацетиляторов изониазида и только у 1/29 (3,4%) быстрого ацетилятора; $p=0,000$, у промежуточных ацетиляторов клинические симптомы гепатотоксичности отсутствовали. 11/37 (29,7%) медленных ацетиляторов жаловались на тошноту и/или рвоту, 5/37 (13,5%) — на анорексию, 4/37 (10,8%) — на слабость и боль в животе. Противотуберкулёзные средства временно отменяли 5/29 пациентам (17,2%) с быстрым типом ацетилирования, 4/46 (8,7%) — с промежуточным и 8/37 (21,6%) — с медленным. Различия между группами были недостоверными ($p=0,248$). После отмены противотуберкулёзных средств и/или проведения дезинтоксикационной и гепатопротективной терапии у всех пациентов, независимо от типа ацетилирования, клинические симптомы гепатотоксичности проходили, активность ферментов крови нормализовалась. Больные смогли продолжить приём препаратов.

С помощью критерия Манна–Уитни установлены значимые различия суточных доз изониазида, назначаемого пациентам с разным типом ацетилирования. Быстрые ацетиляторы получали изониазид в дозе 600,0 [525,0; 600,0] мг/сут, медленные — в дозе 525,0 [450,0; 600,0] мг/сут, промежуточные —

в дозе 600,0 [450,0; 600,0] мг/сут. Суточные дозы изониазида, принятые быстрыми и медленными ацетиляторами, значительно отличались ($p=0,020$). Дозы, полученные медленными и промежуточными ацетиляторами, также оказались различными ($p=0,037$). Средние суточные дозы рифампицина, пиразинамида и этамбутола, назначенных в интенсивной фазе лечения туберкулёза, у всех пациентов были примерно одинаковыми.

Курсовая доза противотуберкулёзных средств и длительность стационарного лечения в интенсивной фазе терапии туберкулёза не отличались у пациентов с разными вариантами типа ацетилирования.

Обеспечение эффективного и безопасного применения противотуберкулёзных средств является актуальной и приоритетной задачей современной фтизиатрии. В клинической практике это реализуется за счёт врачебной оценки соотношения польза/риск.

Гепатотоксические реакции разной степени тяжести вызывают многие противотуберкулёзные средства, а их проявления варьируют от бессимптомной гиперферментемии до тяжёлой печёночной недостаточности и цирроза печени [22]. Роль изониазида как этиологического фактора риска развития гепатотоксических реакций установлена и хорошо изучена.

При приёме изониазида активность АЛТ в сыворотке крови транзиторно повышается у 10–20% пациентов с туберкулёзом органов дыхания, тяжёлые повреждения печени и даже печёночная недостаточность могут развиваться у 1–3% пациентов [5, 18]. В большинстве случаев повреждение печени, вызванное изониазидом, протекает бессимптомно и выявляется только при определении в крови маркеров повреждения гепатоцитов, таких как АЛТ и аспартатаминотрансферазы (АСТ) [18]. При приёме изониазида преобладает гепатоцеллюлярный тип повреждения печени, для него характерно выраженное увеличение активности АЛТ (в 10 раз выше верхней границы нормы) и минимальный рост активности ЩФ (менее чем в 2 раза выше верхней границы нормы) [5]. Активность АЛТ и АСТ может повышаться в срок от 1 нед до 9–12 мес после начала лечения изониазидом [18, 23]. Гепатотоксические реакции при приёме изониазида клинически проявляются такими симптомами, как слабость, боль в животе, желтуха, тошнота и рвота, но аллергические реакции (лихорадка, кожная сыпь, артралгия, эозинофилия) возникают редко [24].

Среди участников нашего исследования гепатотоксичность изониазида диагностировали у 24,1% пациентов, среднее время развития поражения печени — 24 сут после начала интенсивной фазы лечения туберкулёза. Гепатотоксичность проявлялась повышением в сыворотке крови активности АЛТ у 88,9% пациентов, клиническими симптомами патологии печени — у 44,4%.

Для повышения безопасности лекарственной терапии необходимо выявлять группы пациентов, ассоциированные с повышенным риском развития нежелательных побочных реакций, и разработать комплекс мероприятий, направленных на своевременное прогнозирование, предотвращение и устранение этих реакций. Группой риска гепатотоксических реакций при лечении изониазидом являются пациенты с медленным типом ацетилирования [1, 12, 19, 25, 26].

В группе медленных ацетиляторов риск развития гепатотоксичности в 4,6 раза выше, по сравнению с риском у быстрых ацетиляторов [4]. В нашем исследовании у быстрых ацетиляторов гепатотоксические реакции появлялись в 2,1 раза чаще, чем у медленных ацетиляторов. В группе медленных ацетиляторов гепатотоксичность развивалась раньше, чем у быстрых и промежуточных. Клинические проявления гепатотоксичности в 8,7 раз чаще регистрировали у медленных ацетиляторов по сравнению с быстрыми.

Полученные результаты позволили сделать заключение, что для своевременной диагностики гепатотоксических реакций при приёме изониазида необходимо проводить регулярную оценку клинических данных и контроль лабораторных показателей в сроках, опережающих появление гепатотоксических реакций. При лечении туберкулёза изониазидом рекомендуем 1 раз в 7–10 дней определять в крови активность АЛТ, ЩФ, содержание общего билирубина с целью ранней диагностики поражения печени.

У большинства пациентов функции печени при гепатотоксических реакциях возвращаются к норме, несмотря на продолжающееся лечение изониазидом [27], но всё же продолжающаяся терапия способна многократно усилить выраженность морфологических изменений в печени и клинических проявлений её патологии, в итоге существенно повлиять на исход заболевания [28]. Первой линией лечения гепатотоксических реакций является своевременная коррекция противотуберкулёзной терапии (снижение разовых/суточных доз лекарственных средств до минимально эффективных или отмена препаратов до пол-

ного купирования гепатотоксических реакций). В нашем исследовании медленным ацетиляторам изониазид назначали в меньших дозах, чем быстрым и промежуточным.

Ограничения исследования. В исследовании есть ограничения. Ограничениями исследования является малый размер выборки. Однако размер выборки сопоставим с выборками в других аналогичных исследованиях, результаты которых опубликованы. В среднем за год (по данным 2018–2019 гг.) в Республике Саха (Якутия) впервые туберкулёзом органов дыхания заболевают $465 \pm 6,36$. В исследование было включено 112 пациентов, что составляет 24% от числа всех лиц с впервые выявленным (в течение 12 мес) туберкулёзом органов дыхания. Таким образом, можно предположить, что выборочная совокупность достаточно репрезентативна по отношению к генеральной совокупности пациентов с туберкулёзом органов дыхания.

Заключение

При проведении интенсивной фазы лечения лекарственно-чувствительного туберкулёза органов дыхания гепатотоксические реакции часто развиваются у пациентов с медленным типом ацетилирования. Гепатотоксические реакции у медленных ацетиляторов от начала лечения туберкулёза развиваются рано и чаще проявляются повышением активности АЛТ. На основании проведённого исследования можно сделать заключение, о том, что, медленный тип ацетилирования следует считать основным фактором риска гепатотоксичности при приёме изониазида у пациентов с туберкулёзом органов дыхания. Фармакогенетическое исследование необходимо внедрять в практическую фтизиатрию для повышения безопасности лечения лекарственно-чувствительного туберкулёза органов дыхания путём разработки комплексного подхода к прогнозированию и профилактике гепатотоксических реакций.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Khan S., Mandal R.K., Elashbali A.M., Dar S.A., Jawed A., Wahid M. et al. Pharmacogenetic association between NAT2 gene polymorphisms and isoniazid induced hepatotoxicity: trial sequence meta-analysis as evidence. *Biosci Rep* 2019; 39 (1): BSR20180845. doi: 10.1042/BSR20180845.
2. Rens N.E., Uyl-de Groot C.A., Goldhaber-Fiebert J.D., Croda J., Andrews J.R. Cost-Effectiveness of a Pharmacogenomic Test for Stratified Isoniazid Dosing in Treatment of Active Tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2020; 6: ciz1212. doi: 10.1093/cid/ciz1212.
3. Imam F., Sharma M., Khayyam K.U., Khan M.R., Ali M.D., Qamar W. Determination of isoniazid acetylation patterns in tuberculosis patients receiving DOT therapy under the Revised National tuberculosis Control Program (RNTCP) in India. *Saudi Pharm J* 2020; 28 (6): 641–647. doi: 10.1016/j.sps.2020.04.003.
4. Сналина Н.Е., Сычев Д.А. Генетические предикторы гепатотоксичности изониазида. Молекулярная медицина. — 2018. — Т. 16. — № 2. — С. 31–36. / Snalina N.E., Sychev D.A. Genetic predictors of isoniazid hepatotoxicity. *Molecular Medicine* 2018; 16 (2): 31–36. [in Russian] doi:10.29296/24999490-2018-02-04.
5. Wang P., Pradhan K., Zhong X-bo, Ma X. Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. *Acta Pharm* 2016; 6 (5): 384–392. doi: 10.1016/j.apsb.2016.07.014.
6. Mthiyane T., Millard J., Adamson J., Balakrishna Y., Connolly C., Owen A. et al. N-Acetyltransferase 2 Genotypes among Zulu-Speaking South Africans and Isoniazid and N-Acetyl-Isoniazid Pharmacokinetics during Antituberculosis Treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64 (4): e02376-19. doi: 10.1128/AAC.02376-19.
7. Удут В.В., Венгеровский А.И., Буркова В.Н., Ваизова О.Е., Коришун Д.А. Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на перекисное окисление липидов печени и содержание цитокинов в крови при экспериментальной патологии, вызванной изониазидом. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2012. — № 6. — С. 47–52. / Udut V.V., Vengerovskii A.I., Burkova V.N., Vaizova O.E., Korshunov D.A.

- Vliyaniye gepatoprotektorov fosfolipidnoi prirody na perekisnoe okislenie lipidov pecheni i soderzhanie tsitokinov v krovi pri eksperimental'noi patologii, vyzvannoi izoniazidom. *Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Gastroenterologiya* 2012; 6: 47–52. [in Russian]
8. Yew W.W., Chang K.C., Chan D.P. Oxidative Stress and First-Line Antituberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62 (8): e02637-17. doi: 10.1128/AAC.02637-17.
 9. Erwin E.R., Addison A.P., John S.F., Olaleye O.A., Rosell R.C. Pharmacokinetics of isoniazid: The good, the bad, and the alternatives. *Tuberculosis (Edinb)* 2019; 116: Suppl: S66–S70. doi: 10.1016/j.tube.2019.04.012
 10. Ивашкин В.Т., Барановский А.Ю., Райхельсон К.Л., Пальгова Л.К., Маевская М.В., Кондрашина Е.А., и др. Лекарственные поражения печени (клинические рекомендации для врачей). *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. — 2019. — Т. 29. — №1. — С.85–115. / Ivashkin V.T., Baranovsky A.Yu., Raikhelson K.L., Palgova L.K., Maevskaya M.V., Kondrashina E.A. et al. Drug-Induced Liver Injuries (Clinical Guidelines for Physicians). *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2019; 29 (1): 85–115. [in Russian]. doi: 10.22416/1382-4376-2019-29-1-101-131.
 11. Jarrar Y.B., Balasme A.A., Jarrar W. Sequence analysis of the N-acetyltransferase 2 gene (NAT2) among Jordanian volunteers. *Libyan J Med* 2018; 13 (1): 1408381. doi: 10.1080/19932820.2017.1408381.
 12. Suvichapanich S., Fukunaga K., Zahroh H., Mushiroda T., Mahasirimongkol S., Toyo-Oka L. et al. NAT2 ultralow acetylator and risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a genotype-based meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2018; 28 (7): 167–176. doi: 10.1097/FPC.0000000000000339.
 13. Zhang M., Wang S., Wilffert B., Tong R., Soolingen D., Hof Svd., Alffenaar J.W. The association between the NAT2 genetic polymorphisms and risk of DILI during anti-TB treatment: a systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2018; 84 (12): 2747–2760. doi: 10.1111/bcp.13722.
 14. Garcia-Martin E. Interethnic and intraethnic variability of NAT2 single nucleotide polymorphisms. *Current Drug Metabolism* 2008; 9 (6): 487–497. doi: 10.2174/138920008784892155.
 15. Wei Z., Zhang M., Zhang X., Yi M., Xia X., Fang X. NAT2 gene polymorphisms and endometriosis risk: A PRISMA-compliant meta-analysis. *PLoS One* 2019; 14 (12): e0227043. doi: 10.1371/journal.pone.0227043.
 16. Yadav D., Kumar R., Dixit R.K., Kant S., Verma A., Srivastava K. et al. Association of NAT2 gene polymorphism with antitubercular drug-induced hepatotoxicity in the Eastern Uttar Pradesh population. *Cureus* 2019; 11 (4): e4425. doi: 10.7759/cureus.4425.
 17. Wichukhinda N., Pakdee J., Kunhapan P., Imunchot W., Toyo-oka L., Tokunaga K. et al. Haplotype-specific PCR for NAT2 genotyping. *Hum Genome Var* 2020; 7 (13). doi: 10.1038/s41439-020-0101-7.
 18. Metushi I., Uetrecht J., Phillips E. Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. *Br J Clin Pharmacol* 2016; 81 (6): 1030–1036. doi: 10.1111/bcp.12885.
 19. Wang P.Y., Xie S.Y., Hao Q., Zhang C., Jiang B.F. NAT2 polymorphisms and susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16 (5): 589–595. doi: 10.5588/ijtld.11.0377.
 20. EASL Clinical Practice Guidelines: Drug-induced liver injury. *J Hepatol* 2019; 70 (6): 1222–1261. doi: 10.1016/j.jhep.2019.02.014.
 21. Kuznetsov I.B., McDuffie M., Moslehi R. A web-server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype. *Bioinformatics* 2009; 25 (9): 1185–1186. doi: 10.1093/bioinformatics/btp121.
 22. Суханов Д.С., Оковитый С.В., Яблонский П.К., Виноградова Т.И., Павлова М.В. Гепатотропная терапия в лечении поражений печени. Антибиотики и химиотер. — 2012. — Т. 57. — №. 5-6. — С. 41–52. / Sukhanov D.S., Okovityi S.V., Yablonskyi P.K., Vinogradova T.I., Pavlova M.V. Hepatotrophic therapy in treatment of liver injury. *Antibiotiki i Khimioter* 2012; 57 (5–6): 41–52. [in Russian]
 23. Долгушина А.И., Волчегорский И.А., Новоселов П.Н., Ушкарева Э.В., Олевская Е.Р., Кузнецова А.С. Гепатотоксичность противотуберкулезных препаратов. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2018. — Т. 156. № 8. — С. 116–124. / Dolgushina A.I., Volchegorsky I.A., Novoselov P.N., Ushkareva E.V., Olevskaya E.R., Kuznetsova A.S. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Experimental and Clinical Gastroenterology* 2018; 156 (8): 116–124. [in Russian] doi: 10.31146/1682-8658-ecg-156-8-116-124.
 24. Klein D.J., Boukouvala S., McDonagh E.M., Shuldiner S.R., Laurieri N., Thorn C.F. et al. PharmGKB Summary: Isoniazid Pathway, Pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics* 2016; 26 (9): 436–444. doi: 10.1097/FPC.0000000000000232.
 25. Иванова Д.А., Галкина К.Ю., Борисов С.Е., Сафонова С.Г., Кудлай Д.А. Фармакогенетические методы в оценке риска гепатотоксических реакций при лечении впервые выявленных больных туберкулезом. Туберкулез и социально значимые заболевания. — 2018. — № 3. — С. 43–48. / Ivanova D.A., Galkina K.Yu., Borisov S.E., Safonova S.G., Kudlai D.A. Risk of the hepatotoxicity evaluation by the pharmacogenetic methods In new tuberculosis patients. *Tuberculosis and Socially Significant Diseases* 2018; 3: 43–48. [in Russian]
 26. Можжикова Г.Н., Казаков А.В., Елистратова Н.А., Попов С.А. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков и персонализация режимов лечения больных туберкулезом. Туберкулез и болезни лёгких. — 2016. — Т. 94. — №. 4. — С. 6–12. / Mzhzhikova G.N., Kazakov A.V., Elistratova N.A., Popov S.A. Biotransformation enzymes for xenobiotics and personalization of treatment regimens for tuberculosis patients. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2016; 94 (4): 6–12. [in Russian] doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-4-6-12.
 27. Stepan A.F., Walker D.P., Bauman J., Price D.A., Baillie T.A., Kalgutkar A.S., Aleo M.D. Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 1345–1410. doi: 10.1021/tx200168d.
 28. Трухан Д.И., Мазуров А.Л. Лекарственные поражения печени: актуальные вопросы диагностики и лечения. Медицинский совет. — 2016. — № 5. — С. 70–73. / Trukhan D.I., Mazurov A.L. Lekarstvennye porazheniya pecheni: aktual'nye voprosy diagnostiki i lecheniya. *Meditsinskii sovet* 2016; 5: 70–73. [in Russian]. doi: 10.21518/2079-701X-2016-05-70-73.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Краснова Наталья Михайловна — к. м. н., доцент кафедры «Госпитальная терапия, профессиональные болезни и клиническая фармакология», Медицинский институт «Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова», Якутск. ORCID: 0000-0002-4811-7801

SPIN-код: 8703-8169. Scopus Author ID: 57205162915

Евдокимова Надежда Евстафьевна — врач фтизиатр, Научно-практический центр «Фтизиатрия», Якутск. ORCID: 0000-0002-0187-280X. SPIN-код: 1169-5154

Егорова Александра Алексеевна — врач фтизиатр, Научно-практический центр «Фтизиатрия», Якутск. ORCID: 0000-0002-3027-2731

Филиппова Ольга Ивановна — Научно-практический центр «Фтизиатрия», Якутск. ORCID: 0000-0003-4213-2901. SPIN-код: 4293-2220

Алексеева Елизавета Александровна — биолог, Центр персонализированной медицины, Республиканская клиническая больница № 3, Якутск. ORCID: 0000-0001-6116-5720. SPIN-код: 8918-7035

Рудых Зоя Александровна — врач клинический фармаколог, Республиканская клиническая больница № 3, Якутск. ORCID: 0000-0001-8212-0150. SPIN-код: 4930-4297

Чертовских Яна Валерьевна — врач клинический фармаколог, заведующая Центром персонализированной медицины, Республиканская клиническая больница № 3, Якутск. ORCID: 0000-0003-0941-8633. SPIN-код: 8485-9530

Венгеровский Александр Исаакович — д. м. н., профессор, зав. кафедрой фармакологии, Сибирский государственный медицинский университет, Томск. ORCID: 0000-0001-5094-3742. SPIN-код: 8818-0543. Scopus Author ID: 6602839346

Кравченко Александр Фёдорович — д. м. н., зам. директора по медицинской помощи в амбулаторных условиях, Научно-практический центр «Фтизиатрия», Якутск. ORCID: 0000-0002-9210-3407. SPIN-код: 3188-6796. Scopus Author ID: 7202732143

Сычев Дмитрий Алексеевич — д. м. н., профессор, член-корр. РАН, ректор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва. ORCID: 0000-0002-4496-3680. SPIN-код: 4525-7556. Scopus Author ID: 7801389135

Разработка турбидиметрической методики количественного определения антибиотиков группы аминогликозидов в лекарственных препаратах для медицинского применения

*Е. Н. СЕМЕНОВА, С. И. КУЛЕШОВА, Е. И. САКАНЯН

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ, Москва

The Development of a Turbidimetric Method for the Quantitative Determination of Antibiotics of the Aminoglycoside Group in Medications

*E. N. SEMENOVA, S. I. KULESHOVA, E. I. SAKANYAN

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

Разработана и валидирована методика количественного определения стрептомицина сульфата в лекарственных средствах турбидиметрическим методом. По результатам экспериментов было установлено, что метрологические характеристики таких валидационных параметров методики, как линейность, прецизионность, правильность, не превышают валидационные критерии. Линейность отмечена в диапазоне концентраций стрептомицина от 3,75 до 8,43 мкг/мл. Результаты валидационных испытаний методики количественного определения стрептомицина свидетельствуют о перспективности и целесообразности внедрения турбидиметрического метода в отечественную систему стандартизации и оценки качества аминогликозидных антибиотиков.

Ключевые слова: аминогликозидный антибиотик, количественное определение, турбидиметрический метод, стандартизация, оценка качества.

A method for the quantitative determination of streptomycin sulfate in medicines by the turbidimetric method has been developed and validated. Based on the results of the experiments, it was found that the metrological characteristics of such validation parameters of the method as linearity, precision, and correctness do not exceed the validation criteria. Linearity was noted in the range of streptomycin concentrations from 3.75 to 8.43 µg/ml. The results of validation tests of the method for the quantitative determination of streptomycin indicate the prospects and feasibility of introducing the turbidimetric method into the domestic system for standardization and quality assessment of aminoglycoside antibiotics.

Keywords: aminoglycoside antibiotic, quantitative determination, turbidimetric method, standardization, quality assessment.

Введение

Стратегия развития фармацевтической отрасли Российской Федерации на период до 2020 г., а также Стратегия медицинского обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 г. обозначают в качестве одного из главных приоритетов государственной политики разработку конкурентоспособных импортозамещающих отечественных ЛС, в том числе, антибиотиков. Реализация этой задачи требует в свою очередь также совершенствования методов их стандартизации и последующей оценки качества [1, 2].

Одним из основных показателей качества антибиотиков является количественное определение. Методы, используемые для этих целей, их специфичность, чувствительность, воспроизво-

димось и т. д. постоянно совершенствуются и модифицируются, так как правильный их выбор определяет в дальнейшем и качество ЛС.

Известны различные методы количественного определения антибиотиков: биологические, например, метод последовательных разведений, диффузионный и турбидиметрические методы; спектроскопические, хроматографические, и другие. Каждый метод имеет область своего применения и характеризуется как определёнными преимуществами, так и недостатками.

В последние годы широкое распространение для количественного определения антибиотиков, в частности для антибиотиков полусинтетического происхождения, получили методы физико-химического анализа. Наиболее широко используются в фармакопейной практике методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и УФ-спектроскопии. Они обладают высокой воспроизводимостью и точностью, однако требуют ис-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Петровский б-р, д. 8, стр. 2, г. Москва, 127051

пользования дорогостоящего оборудования и высокотоксичных органических растворителей, а также, в ряде случаев, отличаются длительностью анализа из-за необходимости предварительной пробоподготовки. Несмотря на распространение методов физико-химического анализа, микробиологические методы по-прежнему актуальны, а для некоторых антибиотиков остаются незаменимыми. Примером таких антибиотиков являются ЛС группы аминогликозидов. Это связано с особенностями химического строения антибиотиков группы аминогликозидов, в связи с чем, применение и развитие физико-химических методов для них затруднено [3].

На сегодняшний день ведущими зарубежными фармакопеями (USP, Ph. Eur., BP, JP) для количественного определения антибиотиков группы аминогликозидов рекомендованы два биологических метода: метод диффузии в агар и турбидиметрический метод. Однако следует отметить, что в отечественной фармакопейной практике (Фармакопеях СССР и ГФ РФ) применяется только диффузионный метод [3].

Вместе с тем, турбидиметрический анализ обладает рядом преимуществ: метод экономичен, более чувствителен к низким концентрациям активного компонента и может быть адаптирован для получения точных результатов в короткие периоды времени, что позволяет использовать его как экспресс-метод для определения активности антибиотических препаратов [4].

В связи с этим, представляется своевременным актуализация действующих и разработка новых фармакопейных стандартов качества на ЛС на основе антибиотиков, в том числе, на методы определения их качества, которые должны быть, с одной стороны, гармонизированы с таковыми ведущих фармакопей мира, а, с другой стороны, отражать специфику развития отечественной фармацевтической отрасли.

Цель работы заключается в разработке турбидиметрической методики количественного определения стрептомицина сульфата в лекарственных препаратах для медицинского применения, находящихся в обращении на территории Российской Федерации.

Материал и методы

Препараты антибиотиков, реактивы и материалы. В работе были использованы: препарат «Стрептомицин, порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения, 1 г», Россия; стандартный образец (СО) стрептомицин сульфат — USP RS (активность — 754 мкг/мг, действительный на момент исследования). Для приготовления основных и рабочих растворов стандартного и испытуемого образцов использовали буфер №4 (ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар). Для разработки методики были использованы химические реактивы отечественного и импортного производства с квалификацией не ниже «х. ч.».

Микроорганизмы, питательные среды. В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (для турбидиметрического анализа); *Bacillus cereus*, var. *mycoides* 537 (для метода диффузии в агар), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. При проведении турбидиметрического анализа применяли питательную среду № 3, рекомендованную USP и разработанную питательную среду для турбидиметрии, содержащую компоненты отечественного производства: панкреатический гидролизат казеина (ПГК) (ТУ 9229-240-78095326-2016); гидролизат мяса ферментативный (ГМФ) (ФСП 42-0487-4245-03); экстракт кормовых дрожжей (ТУ 9385-090-14237183-08) и D-глюкоза (ГОСТ 6038-79), pH используемой среды составил $7,2 \pm 0,2$. Определение биологической активности методом диффузии в агар проводили по ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

Условия эксперимента. Штаммы тест-микроорганизмов инкубировали в разработанной жидкой питательной среде для турбидиметрии при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. В день испытания бульонную культуру разбавляли для достижения мутности суспензии $25 \pm 2\%$ (коэффициент пропускания) с использованием спектрофотометра Agilent 8453 (США) и длины волны 580 нм. Полученную суспензию использовали в качестве посевного материала. Для турбидиметрического анализа была выбрана трёхдозная модель параллельных линий (3×3 дизайн; 3 дозы стандарта и 3 дозы образца). На каждые 1000 мл жидкой питательной среды прибавляли 10 мл посевного материала. Затем 9 мл инокулированной среды вносили в пробирку объёмом 20 мл и добавляли 1 мл рабочего раствора стандартного образца с соответствующей концентрацией стрептомицина ($C_1=3,75$, $C_2=5,63$ и $C_3=8,43$ мкг/мл) или 1 мл рабочего раствора испытуемого образца с соответствующей приближительной концентрацией ($T_1=3,75$, $T_2=5,63$ и $T_3=8,43$ мкг/мл). После этого анализируемые смеси инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 4,5 ч. Одновременно инкубировали отрицательный контроль (9 мл стерильной жидкой питательной среды для турбидиметрии и 1 мл буфера № 4) и положительный контроль (9 мл инокулированной жидкой питательной среды и 1 мл буфера № 4). Все пробирки, содержащие стандартный и испытуемый образец в разных концентрациях были подготовлены в шести экземплярах.

По завершении процесса инкубации размножение микроорганизмов останавливали добавлением 0,5 мл 12% раствора формальдегида к каждой из пробирок, в том числе положительных и отрицательных контролей и определяли оптическую плотность взвеси тест-микроорганизмов в пробирках с испытуемым и стандартным образцами, а также контрольных пробирок.

После установления оптимальных условий для получения кривой «доза—реакция», была проведена валидация методики путём определения следующих параметров: линейность, правильность, прецизионность, устойчивость и специфичность [5, 6]. Расчёт биологической активности антибиотиков, математическую и статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с существующими рекомендациями [5] с помощью программных обеспечений Microsoft Office Excel и CombiStats, version 5.0.

Результаты и обсуждение

В настоящее время на фармацевтическом рынке России присутствует более 1000 препаратов на основе антибиотиков. Среди аминогликозидных антибиотиков к числу наиболее важных в практическом отношении относится стрептомицин. Лекарственные препараты на основе стреп-

Таблица 1. Биологический контроль качества жидкой питательной среды для турбидиметрии

Тест-штамм	Наименование биологического показателя	Значение показателя
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	Чувствительность	10 ⁻⁷
	Стабильность основных свойств	Равномерное помутнение среды. Грамположительные кокки в виде гроздей. Оксидазоотрицательны, каталазоположительны
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Чувствительность	10 ⁻⁷
	Стабильность основных свойств	Равномерное помутнение среды. Грамположительные кокки в виде гроздей. Оксидазоотрицательны, каталазоположительны
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Чувствительность	10 ⁻⁷
	Стабильность основных свойств	Равномерное помутнение среды. Грамотрицательные неподвижные палочки. Оксидазоотрицательны, каталазоположительны

томицина используют в комплексной терапии туберкулёза. Стрептомицин обладает эффективным действием в отношении особо опасных инфекций (чума, туляремия, бруцеллёз) и не может быть с полным успехом заменён сегодня даже современными полусинтетическими антибиотиками [7].

Государственная Фармакопея Российской Федерации для количественного определения стрептомицина в лекарственных средствах рекомендует использование метода диффузии в агар. Этот метод основан на способности молекул антибиотика стрептомицина диффундировать в агаровых средах и образовывать зоны угнетения, в которых не развивается тест-микрорганализм, чувствительный к испытываемому антибиотику [5, 8].

Принцип турбидиметрического тестирования заключается в измерении и сравнении степени угнетения роста бактериальной популяции в жидкой питательной среде в результате воздействия испытываемого образца и стандартного образца в определённых концентрациях.

В связи с этим, на первом этапе необходимо было разработать состав жидкой питательной среды, которая, с одной стороны, соответствовала бы питательным потребностям тест-микрорганализмов, обеспечивая их хороший рост, а с другой стороны, отвечала требованиям, предъявляемым к питательным средам для турбидиметрии, т. е. была прозрачной и неинтенсивно окрашенной. Состав питательной среды и оценка её качества описаны в работе [9].

Необходимо отметить, что в качестве основного источника белка в жидкой питательной среде для турбидиметрии используется ПГК, получаемый в процессе ферментативного гидролиза из казеина и отличающийся от других источников белка (например, мясной ткани) постоянством состава и содержанием всех основных аминокислот и витаминов. В качестве источника углеводов в жидкую питательную среду для турбидиметрии были добавлены глюкоза и дрожжевой экстракт. Дрожжевой экстракт является дополнительным источником витаминов, макро- и микроэлементов.

Данные, приведённые в табл. 1, подтверждают, что состав разработанной жидкой питательной среды для турбидиметрии достаточен для

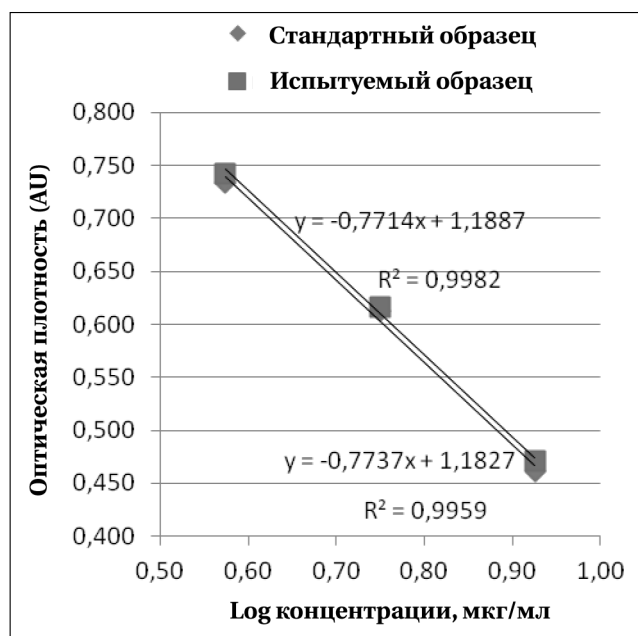
удовлетворения функции энергообеспечения и роста тест-микрорганализмов.

Как видно из табл. 1, тест-микрорганализм *S. aureus* ATCC 6538 P в разработанной жидкой питательной среде даёт равномерный рост без образования плёнки и осадка, что важно для проведения анализа турбидиметрическим методом, и в ходе проведённых экспериментальных исследований был выбран как высокочувствительный к стрептомицину тест-микрорганализм для дальнейшего использования при количественном определении его в лекарственных средствах.

Проверка правильности выбранных условий эксперимента и валидация методики. Определение биологической активности при использовании трёхдозной модели параллельных линий проводят путём сравнения линий дозозависимости стандартного и испытываемого образцов (т.е. сравнения степени угнетения роста бактериальной популяции в результате воздействия испытываемого образца и стандартного образца в определённых концентрациях). Об угнетении роста тест-микрорганализма судят по величине мутности среды (оптическая плотность взвеси тест-микрорганализма), которая измеряется фотометрически после инкубации. Выбранная модель предполагает, что взаимосвязь между логарифмом доз и оптической плотностью взвеси тест-микрорганализма должна быть представлена в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных концентраций; прямая линия испытываемого образца должна быть параллельна соответствующей прямой линии стандартного образца [5, 10].

На рисунке представлена выявленная зависимость измеряемого параметра (оптической плотности взвеси тест-микрорганализма) от концентрации определяемого антибиотика. Прямолинейную зависимость наблюдали на протяжении всего исследуемого диапазона концентраций стрептомицина от 3,45 до 8,43 мкг/мл. О тесной линейной связи и корреляции между зависимой и объясняющей переменными можно судить по коэффициенту детерминации R^2 .

В соответствии с требованиями ОФС 1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологи-



Зависимость оптической плотности взвеси тест-микроорганизма *S. aureus* ATCC 6538 P от концентрации стрептомицина

Примечание. Уравнения линейной регрессии и значения коэффициентов детерминации: $y = -0,7737x + 1,1827$; $R^2 = 0,9959$ для стандартного образца; $y = -0,7714x + 1,1887$; $R^2 = 0,9982$ для испытуемого образца.

ческими методами» [5], был проведен дисперсионный анализ, который подтвердил правильность полученных данных и значительную регрессию ($p < 0,01$), характеризующую статистическую значимость дозозависимости, параллельность двух линий регрессии, свидетельствующую, что различия между наклоном прямых испытуемого и стандартного образцов статистически незначимы («Параллельность»), линейность дозозависимости («Линейность», «Квадратичность» и «Разность квадратичностей») (табл. 2).

Для анализа специфичности оценивали способность методики определять антимикробную активность стрептомицина в отношении подоб-

ранного тест-штамма. Специфичность была подтверждена использованием высокочувствительного к стрептомицину тест-микроорганизма *S. aureus* ATCC 6538 P, а также отсутствием угнетения роста тест-штамма в контрольной пробирке (положительный контроль, т.е. содержащий только инокулированную питательную среду и растворитель (буфер № 4)).

Прецизионность исследовали на двух уровнях: повторяемость (сходимость) и внутрилабораторная прецизионность.

Повторяемость разработанной методики оценивали по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории в пределах короткого промежутка времени, т. е. по результатам параллельных определений ($RSD = 0,62$).

Внутрилабораторную прецизионность валидируемой методики определяли в условиях работы одной лаборатории, но в разные дни ($RSD = 2,79$).

Данные, приведённые в табл. 3, свидетельствуют о пригодности разработанной методики по валидационному параметру надёжность, так как использование разных питательных сред для турбидиметрии (№3, рекомендованной USP и разработанной нами жидкой питательной среды), и небольшие изменения времени инкубации и длины волны не влияли на определение антимикробной активности стрептомицина в лекарственных средствах.

Согласно Руководству по валидации методик анализа лекарственных средств [6], правильность методики характеризуется степенью близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений к принятому опорному (истинному) значению. Оценка правильности может быть выполнена несколькими способами, одним из которых является сравнение результатов, полученных с использованием валидируемой методики и фармакопейного метода (табл. 4).

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	$F_{\text{набл.}}$	$F_{\text{критич.}}$	
Регрессия	1	0,369648	0,369648	833,849	>8,1	$p = 99\%$
Параллельность	1	0,00045000	0,00045000	0,001	<4,35	$p = 95\%$
Линейность	1	0,00104723	0,00104723	1,181	<4,35	$p = 95\%$
Квадратичность	1	0,00100042	0,00100042	2,257	<4,35	$p = 95\%$
Разность квадратичностей	1	0,00004681	0,00004681	0,106	<4,35	$p = 95\%$

Таблица 3. Результаты проверки устойчивости количественного определения стрептомицина турбидиметрическим методом

Параметр	Модифицированные условия	Нормальные условия	Устойчивость методики
Время инкубации (мин)	265	270	Устойчива
	275		
Длина волны (нм)	525	530	Устойчива
	535		
Питательная среда	№ 3 Разработанная питательная среда	Разработанная питательная среда	Устойчива

Таблица 4. Сравнительная оценка биологических методов количественного определения стрептомицина

Метод анализа	Время выполнения анализа (инкубации), ч	Среднее содержание стрептомицина, %	RSD, %
Турбидиметрическая методика	4,5	100,1	2,3
Диффузия в агар	18–20	98,6	0,80

На основании данных анализа можно сделать вывод о том, что с вероятностью 95% не существует статистически значимых различий между результатами, полученными с использованием обеих методик ($t_{\text{расч.}}=1,21 < t_{\text{крит.}}=2,45$).

По совокупному установлению соответствий критериям приемлемости прецизионности, линейности и специфичности, можно сделать заключение о правильности валидируемой методики.

Заключение

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о возможности при-

менения разработанной методики для определения количественного содержания стрептомицина в лекарственных препаратах, находящихся в обращении на территории Российской Федерации.

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

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Юргель Н.В. Система надзора и контроля в сфере обращения лекарственных средств в Российской Федерации. Вестник Росздравнадзора. — 2008. — № 6. — С. 4–11. / *Jyurgel' N.V. Sistema nadzora i kontrolya v sfere obrashcheniya lekarstvennykh sredstv v Rossijskoj Federatsii. Vestnik Roszdravnadzora* 2008; 6: 4–11. [in Russian]
2. Саканян Е.И. Надлежащая фармакопейная практика: современные аспекты развития. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2013. — № 1. — С. 60–62. / *Sakanyan E.I. Nadlezhashchaya farmakopeynaya praktika: sovremennyye aspekty razvitiya. Vestnik Nauchnogo Tsentra Ekspertizy Sredstv Meditsinskogo Primeneniya* 2013; 1: 60–62. [in Russian]
3. Семенова Е.Н., Саканян Е.И., Кулешова С.И. Сравнительная характеристика методов количественного определения, используемых при стандартизации и последующей оценке качества антибиотиков. Вестн. военно-мед. Академии. — 2017. — Т. 63. — № 7–8. — С. 53–57. / *Semenova E.N., Sakanyan E.I., Kuleshova S.I. Sravnitel'naya kharakteristika metodov kolichestvennogo opredeleniya, ispol'zuemykh pri standartizatsii i posleduyushchej otsenke kachestva antibiotikov. Vestnik Voenno-Med. Akademii* 2017; 63: 7–8: 53–57. [in Russian]
4. Олещук Ю.В., Семенова Е.Н., Кулешова С.И., Саканян Е.И. Применение турбидиметрического метода анализа для стандартизации и оценки качества антибиотиков группы аминогликозидов и лекарственных препаратов на их основе. Антибиотики и химиотер. — 2018. — Т. 36. — № 7–8. — С. 62–66. / *Oleshchuk Yu.V., Semenova E.N., Kuleshova S.I., Sakanyan E.I. Primenenie turbidimetricheskogo metoda analiza dlya standartizatsii i otsenki kachestva antibiotikov gruppy aminoglikozidov i lekarstvennykh preparatov na ikh osnove. Antibiotiki i khimioter* 2018; 36: 7–8: 62–66. [in Russian]
5. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Государственная фармакопея РФ. XIV изд. М.: ФЭМБ, 2018. / *Ministerstvo zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii. Gosudarstvennaya Farmakopeya RF. XIV izd. M.: FEMB, 2018. [in Russian]*
6. Юргель Н.В., Младенцев А.Л., Бурдейн А.В., Гетьман М.А., Малин А.А., Косенко В.В. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. М. Министерство здравоохранения и социального развития РФ; 2007. / *Jyurgel' N.V., Mladentsev A.L., Burdeyn A.V., Get'man M.A., Malin A.A., Kosenko V.V. Rukovodstvo po validatsii metodik analiza lekarstvennykh sredstv. M. Ministerstvo zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitiya RF; 2007. [in Russian]*
7. Навашина С.М., Фомина И.П., Сазыкин Ю.О. Антибиотики группы аминогликозидов. М.: Медицина; 1977. / *Navashin S.M., Fomina I.P., Sazykin Yu.O. Antibiotiki gruppy aminoglikozidov. M.: Meditsina; 1977. [in Russian]*
8. Кулешова С.И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2015. — № 3. — С. 13–17. / *Kuleshova S.I. Opredelenie aktivnosti antibiotikov metodom diffuzii v agar. Vestnik Nauchnogo Tsentra Ekspertizy Sredstv Meditsinskogo Primeneniya* 2015; 3: 13–17. [in Russian]
9. Саканян Е.И., Семенова Е.Н., Кулешова С.И. и др. Разработка и оценка качества новой питательной среды для количественного определения антибиотиков турбидиметрическим методом. Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. — 2018. — № 20. — С. 21–26. / *Sakanyan E.I., Semenova E.N., Kuleshova S.I. i dr. Razrabotka i otsenka kachestva novoy pitatel'noj sredy dlya kolichestvennogo opredeleniya antibiotikov turbidimetricheskim metodom. Voprosy Obespecheniya Kachestva Lekarstvennykh Sredstv* 2018; 20: 21–26. [in Russian]
10. Hewitt W. Microbiological assay for pharmaceutical analysis. Interharm/CRC; 2003.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Семенова Екатерина Николаевна — Эксперт I категории лаборатории антибиотиков Испытательного Центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Кулешова Светлана Ивановна — к. б. н., Начальник лаборатории антибиотиков Испытательного Центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат биологических наук, Москва

Саканян Елена Ивановна — д. фарм. н., профессор

Полисахариды морских водорослей — перспективные средства патогенетической терапии инфекционной диареи

Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, *Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹,
С. П. КРЫЖАНОВСКИЙ², Л. Г. ГУСЕВА², Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА³

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

² Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Marine Algae Polysaccharides — a Promising Means of Pathogenetic Therapy of Infectious Diarrhea

N. N. BESEDNOVA¹, *T. A. KUZNETSOVA¹, T. S. ZAPOROZHETS¹, S. P. KRYZHANOVSKY², L. G. GUSEVA², T. N. ZVYAGINTSEVA³

² Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² Medical Association of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok

³ G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok

В обзоре с современных позиций рассмотрены вопросы патогенеза и терапевтические мишени при инфекционной диарее, развивающейся в результате воздействия вирусов или бактериальных токсинов на энтероциты. Охарактеризованы основные методы лечения инфекционной диареи и недостатки стандартной терапии. Представлены современные сведения о биологической активности (бактерицидные/бактериостатические, противовирусные, антибиоплённые, противовоспалительные, иммуномодулирующие и антиоксидантные свойства) полисахаридов морских водорослей. Оценены возможности использования полисахаридов морских водорослей в качестве основы лекарственных препаратов, БАД к пище и продуктов функционального питания для профилактики и терапии инфекционной диареи.

Ключевые слова: морские водоросли, полисахариды, инфекционная диарея, патогенетические мишени, гастроэнтерология.

The review considers the current views on pathogenesis and therapeutic targets in infectious diarrhea that develops as a result of exposure of enterocytes to viruses or bacterial toxins. The main methods of infectious diarrhea treatment and disadvantages of standard therapy are described. Modern data on the biological activity (bactericidal/bacteriostatic, antiviral, anti-biofilm, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antioxidant properties) of marine algae polysaccharides are presented. The possibilities of using seaweed polysaccharides as the basis of medicines, dietary supplements and functional food products for the prevention and treatment of infectious diarrhea are evaluated.

Keywords: marine algae, polysaccharides, infectious diarrhea, pathogenetic targets, gastroenterology.

Введение

Инфекционные заболевания, вызываемые бактериями, вирусами, грибами и паразитами, являются главной угрозой общественному здравоохранению и мировой экономике.

Острая диарея (ОД) — одна из самых распространённых болезней с глобальной заболеваемостью — по разным данным, от 1 млрд до 2,2 млрд случаев в год [1–3]. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) определяет её как симптом инфекций, вызываемых большим числом бактерий, вирусов и паразитов, большинство из которых распространяется через заражённую фекалиями воду. Это вторая по значимости причина летальности у детей в возрасте до 5 лет, осо-

бенно в развивающихся странах. Ежегодно от этой болезни умирает более 520 000 детей данной возрастной группы [4]. В России в 2016 г. показатель заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ), ассоциированными с ОД, составил около 800 000 человек [5]. В целом ежегодно около 0,05% случаев ОД завершаются летальным исходом [6].

В развитых странах в этиологической структуре ОД преобладают вирусы, в развивающихся — преимущественно бактерии [7, 8]. Острая диарея является результатом воздействия вирусов или бактериальных токсинов на энтероциты, что, с одной стороны, приводит к гиперсекреции воды в тонкой кишке, а с другой — к сниженной реабсорбции жидкости [7].

ВОЗ подразделяет диарею на три типа: острую водянистую, продолжающуюся несколько часов или дней (к этому типу относится холера), острую

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Сельская, 1, Владивосток, 690087, e-mail: takuznets@mail.ru

кровавую (она называется дизентерией) и устойчивую (продолжается две недели и более длительное время) [4]. За рубежом все клинически манифестные варианты болезни принято делить на острые (до 14 дней) и персистирующие (более 14 дней) [9].

Выделяют 4 патофизиологических типа диареи — секреторную, моторную, осмотическую и экссудативную [10]. Практически все острые инфекционные диареи являются секреторными [11]. Секреторная диарея обусловлена прямой стимуляцией цАМФ-зависимой секреции воды и электролитов в просвет тонкой и /или толстой кишки при действии агентов, вызывающих секрецию [12]. Такими агентами могут быть бактериальные токсины (холерный, сальмонеллёзный, термостабильный токсин кишечной палочки, шигелл, стафилококка и др.), энтеровирусы и пр.

Классическим примером острой секреторной диареи является холера. Сюда же относится «диарея путешественников», характеризующаяся персистирующей водной диареей средней тяжести. Основной причиной диареи путешественников, ежегодно поражающей более 10 млн туристов, посещающих развивающиеся страны, является токсигенная *E.coli* ЕТЕС [13]. Кроме того, *E.coli*-инфекция представляет существенную проблему в сельском хозяйстве, особенно для новорождённых поросят с ранним отъёмом от грудного вскармливания [13]. Бактериальная диарея характеризуется лихорадкой, рвотой, болью в животе, тошнотой и анорексией. Болезнь является одним из факторов формирования хронической патологии ЖКТ. По механизму развития диареи классифицируются на невоспалительные и воспалительные [14]. Невоспалительная диарея вызывается энтеротоксин-продуцирующими микроорганизмами и вирусами. Воспалительная диарея вызывается двумя группами микроорганизмов — цитотоксин-продуцирующими неинвазивными бактериями или инвазивными микроорганизмами [15].

Наиболее распространёнными возбудителями диареи в странах с низким уровнем дохода являются ротавирусы и кишечная палочка [4].

По данным международных исследований, от 50 до 80% случаев ОКИ у детей обусловлены диареогенными вирусами, в первую очередь — ротавирусами группы А и норовирусами 2-го генотипа [16]. Среди этиологически расшифрованных диарей ротавирус выявляется в 65% случаев, среди них смертельных — более 190 000 [17].

Наиболее распространёнными возбудителями бактериальной диареи, кроме кишечной палочки, являются *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus* [18]. В качестве одной из значимых причин возникновения диареи следует назвать также паразита *Cryptosporidium parvum* [4].

Основными методами лечения диареи является применение растворов для пероральной регид-

ратации и использование антибиотиков [11]. Однако оба эти метода во многих случаях оказываются неэффективными. Регидратация не может уменьшить продолжительность и тяжесть диареи, а к антибиотикам многие бактерии приобретают резистентность. В связи с этим ведутся поиски новых биологически активных молекул из природного сырья, в том числе и из морских водорослей с терапевтическим потенциалом против инфекционной диареи.

Настоящая работа включает в себя обзор современных представлений о возможности использования полисахаридов морских водорослей в качестве основы лекарственных препаратов, БАД к пище и продуктов функционального питания для профилактики и терапии инфекционной диареи.

Терапевтические мишени при инфекционной диарее

В качестве основных биологически активных компонентов морских водорослей привлекают внимание сульфатированные полисахариды (СПС) благодаря многочисленным полезным биомедицинским свойствам, включая противовоспалительное, антиоксидантное, иммуномодулирующее и антиадгезивное действие.

Полисахариды водорослей — это тип биомакромолекул, которые существуют в качестве структурных компонентов клеточной стенки и в основном представлены целлюлозой, гемицеллюлозой и нейтральными полисахаридами. Содержание полисахаридов в морских водорослях колеблется от 4 до 76% от их сухой массы [19].

Сульфатированные полисахариды морских водорослей обладают антибактериальными (бактериостатическое, бактерицидное, антибиоплёночное действие) и противовирусными свойствами, в том числе и по отношению к возбудителям инфекционной диареи. Появляется всё больше работ, подтверждающих эффективность применения СПС водорослей при экспериментальной инфекционной диарее, вызванной бактериями, вирусами и паразитами. При этом исследования проводятся преимущественно, с микроорганизмами, которые чаще всего вызывают инфекционную диарею у людей.

Так, в настоящее время на территории ряда стран сложилась неблагоприятная обстановка, связанная с распространением инфекционного заболевания, вызванного энтерогеморрагической кишечной палочкой.

Энтерогеморрагические штаммы *E.coli* (ЕНЕС) — группа штаммов кишечной палочки, способных вызывать у людей геморрагическую диарею и гемолитический уремический синдром [20]. Диареогенные штаммы этого микроорганизма по механизму патогенеза делятся на несколько типов: энтеропатогенный (ЕРЕС), энтеротокси-

генный (ETEC), энтероинвазивный (EIEC), энтерогеморрагический (EHEC) и энтероадгезивный (EAEC). Энтероинвазивные *E.coli* регистрируются на всех континентах, чаще в развивающихся странах, энтеротоксигенные — в развивающихся странах тропических и субтропических регионов, энтеропатогенные вызывают sporadическую заболеваемость во всех климатических зонах, энтерогеморрагические и энтероадгезивные выявлены в странах Северной Америки и Европы среди взрослых и детей старше 1 года.

В. Liu и соавт. [21] на модели диареи у мышей, вызванной внутрибрюшинным введением энтеротоксигенной кишечной палочки ETEC-K88 (LD₅₀ — 4×10^8 КОЕ), исследовали защитное действие двух полисахаридов (животные получали их перорально) из красных водорослей *Porphyra haitanensis* (PHSP) и *Gracilaria lemaneiformis* (GLSP). Полисахариды извлекали дистиллированной водой под высоким давлением при 121°C в течение 5 ч с последующим осаждением этанолом. Общее содержание сахара в экстрагированном веществе было выше 98%, белок присутствовал в незначительном количестве. Средняя молекулярная масса PHSP составляла 165,45 kDa. Полисахарид GLSP был представлен двумя фракциями с молекулярными массами (М.м.) 71,87 kDa (96,36%) и 1641,95 kDa (3,64%). Сульфаты в PHSP составляли 10,94%, в GLSP — 11,26%. Результаты определения инфракрасного спектра полисахаридов показали пики поглощения 1030 см⁻¹ и 890 см⁻¹, что свидетельствовало о том, что они являются типичными полисахаридами агарового типа [22]. Вязкость полисахаридов составляла 0,17 дл/г и 0,10 дл/г, соответственно. Следует заметить, что уменьшение М.м. и, соответственно, вязкости биополимеров, что достигалось действием высокого давления, может быть полезным для пищеварения и всасывания в кишечнике. Полисахариды снижали интенсивность диареи и предотвращали потерю массы у животных. Ранозаживляющий эффект полисахаридов был документирован в эксперименте на культуре мышинных макрофагов RAW264.7 путём нанесения повреждения на монослой и последующего действия на него полисахаридами.

Первым звеном в развитии диареи, обусловленной *E.coli* ETEC-K88, является связывание токсинов возбудителя с ганглиозидными рецепторами эпителиальных клеток (GM). Основными составляющими полисахаридов из водорослей *P.haitanensis* и *G.lemaneiformis* являются сульфатированные остатки D-галактозы. Аналоги галактозы препятствуют связыванию токсина с GM1. Облегчение течения диареи, вызванной токсигенной *E.coli* ETEC-K88, при помощи PHSP и GLSP, по-видимому, обусловлено блокированием сайтов связывания токсинов

галактозными остатками полисахарида, что препятствует связыванию термолабильного токсина микроорганизма с рецепторами GM1 клеток. Этот токсин связывается с сульфатными рецепторами на клетках кишечного эпителия [23]. Таким образом, полисахариды облегчают течение диареи, обусловленной энтеротоксигенной *E.coli*, в качестве имитаторов токсина в конкуренции за рецепторы [24].

Сканирующая электронная микроскопия позволила подтвердить, что деполимеризованные сульфатированные галактаны морских водорослей могут эффективно ингибировать адгезию токсигенной кишечной палочки. После обработки бактерий полисахаридами наблюдалось гашение флуоресценции мембранных белков. Сульфатированные полисахариды могут конкурентно связываться с патогенными бактериями и эффективно ингибировать инвазию патогенов в клетки-хозяева. Например, деполимеризованные галактаны из красных водорослей *G.verrucosa* (GSP) и *E.sera* (ESP) показали хорошие результаты как ингибиторы адгезии ETEC K-88. Это позволило авторам [24] рекомендовать эти соединения для замены антибиотиков при лечении бактериальной диареи. Основным моносахаридом в них был представлен галактозой. Отличались они содержанием сульфатов (ESP — $28,2 \pm 2,1$; GSP — $13,1 \pm 1,9\%$, от М.м.), уроновой кислоты (ESP — $2,2 \pm 0,3$; GSP — $4,2 \pm 0,4\%$, от М.м.) и 3,6-ангидрогалактозы (ESP — $9,8 \pm 0,3$; GSP — $13,4 \pm 0,5\%$, от М.м.).

Оказалось, что только деполимеризованные галактаны были способны оказывать ингибирующий эффект на ETEC K-88. При этом более активной была низкомолекулярная фракция (≤ 6 kDa) по сравнению с фракцией с М.м. $>6-20$ kDa. Образцы с М.м. >20 kDa активностью не обладали. Ранее те же авторы получили близкие результаты с фукоиданом из бурой водоросли *Laminaria japonica*. Считается, что СПС с низкой М.м. могут легко проникать через клеточные мембраны [25, 26]. Таким образом, одним из факторов, определяющим антибактериальное действие полисахаридов, является величина М.м.

На выраженность антибактериального эффекта СПС по отношению к *E.coli* оказывает число сульфатных групп. В. Liu и соавт. [21] показали, что усиление антибактериального действия СПС против ETEC K-88 обусловлено полианионными свойствами соединения, обеспечивающимися сульфатными группами.

В распознавании и связывании полисахаридами рецепторов на поверхности бактерий значительную роль играет моносахаридный состав СПС. Решающую роль в развитии болезни является взаимодействие адгезинов поверхности микроорганизмов с углеводными цепями гликоконъюгатов (рецепторами клеток-хозяев) [27].

Контакт микроорганизма с клетками хозяина происходит путём молекулярных взаимодействий адгезинов микробной клетки (тонких субмикроскопических мультисубъединичных белковых придатков-фимбрий или пилей), нередко являющихся лектинами, с углеводными рецепторами поверхности тканей хозяина, в результате чего блокируется адгезия бактерий к клеткам эукариот [21, 28].

Для разработки антиадгезивных препаратов необходимо знание эффективных механизмов взаимодействий между лигандами и рецепторами. Одним из наиболее известных механизмов, с учётом которого осуществляется подбор ингибиторов процесса адгезии, является введение в систему «микроорганизм — эукариотические клетки» растворимых веществ, конкурирующих с лигандами или рецепторами за сайты связывания на клеточных поверхностях [27, 29].

Мультивалентные полисахариды, в том числе СПС водорослей, являются эффективными ингибиторами бактериальной адгезии. Растворимые углеводы распознают поверхностные бактериальные лектины и блокируют адгезию бактерий к клеткам эукариот. Штаммы, резистентные к антиадгезивным веществам, появляются значительно реже, чем антибиотикорезистентные [29].

Ингибирование адгезии и колонизации кишечного эпителия слизистой оболочки ЕТЕС К-88 при диарее является важной терапевтической стратегией при этой болезни. Y. Liu и соавт. [3] в качестве модельных клеток использовали штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Ингибиторами адгезии служили деполимеризованные сульфатированные галактаны из морских красных водорослей *G.verrucosa* и *E.serra*. Полисахариды эффективно ингибировали адгезию ЕТЕС К-88, что позволило авторам рекомендовать эти соединения для замены антибиотиков при лечении бактериальной диареи.

Антибактериальное действие сульфатированных полисахаридов по отношению к потенциальным возбудителям диареи известно давно. Возможными мишенями для полисахаридов в бактериальных клетках могут быть клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана и ДНК. Сульфатированные полисахариды бурых водорослей *L.japonica* и *S.swartzii* могут ингибировать рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, в т. ч. *E.coli*, *Vibrio cholera*, *Salmonella typhi* и *S.aureus* [24]. Ульваны из зелёных водорослей (*Chaetomorpha aerea*) и микроводорослей (*Porphyridium cruentum*) оказывали ингибирующее действие на *S.aureus* и *S.enteritidis* [30]. При этом в ряде случаев антибактериальное действие полисахаридов оказывалось даже более сильным, чем антибиотиков. Так, P. Vjayabaskar и соавт. [31], например, обнаружили, что СПС из водоросли *Sargassum swartzii* ингибируют как грамположи-

тельные, так и грамотрицательные микроорганизмы, патогенные для человека. При этом в случае *E.coli* полисахарид был более эффективен, чем ампициллин.

Однако следует заметить, что не все СПС, во-первых, обладают антибактериальным действием, и, во-вторых, ведут себя одинаково по отношению к определённым видам бактерий. Например, J-Y. Jun и соавт. [32] показали, что из всех испытанных фукоиданов (исследованы фукоиданы 11 морских водорослей, включая 4 коммерческих полисахарида) только фукоидан из водоросли *Fucus vesiculosus* ингибировал рост *Listeria monocytogenes* и *S.aureus*.

К настоящему времени уже известно, что СПС водорослей оказывают на бактерии не только адгезивное действие. После связывания с поверхностью бактериальной клетки полисахариды могут также разрушать мембранные структуры микроорганизма [24]. Если мембранные белки бактерии экранированы полисахаридом, то значительно снижается степень флуоресценции таких клеток по сравнению с контрольными (не обработанными полисахаридом). Q. Liu и соавт. [24] установили что после воздействия деполимеризованных галактанов на бактерии в течение 4 ч наблюдалось дозозависимое снижение интенсивности флуоресценции *E.coli* ЕТЕС К-88, а также их морфологические изменения. Бактерии, обработанные полисахаридами, имели сморщенный вид, были деформированы, наблюдалось повышенное высвобождение нуклеиновой кислоты из микроорганизмов. Бактерии, не обработанные полисахаридами, были правильной формы с гладкой поверхностью.

Антидиарейные эффекты СПС могут быть обусловлены не только прямым антимикробным действием. Известно действие этих соединений на формирование биоплёнок патогенных диареегенных возбудителей. Биоплёнки, которые образуют бактерии на слизистой кишечника — ещё одна мишень действия СПС водорослей. Терапевтическое воздействие на биоплёнки может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии бактерий к поверхности, блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией. Кроме того, оно может сочетаться с действием бактерицидных агентов (например, с антибиотиками).

Биоплёнки образуют многие бактерии — возбудители диареи: *P.aeruginosa* [33], *E.coli* [34], *S.aureus* [35], *Salmonella* spp. [36], в связи с чем эти сообщества рассматриваются как мишень для средств антимикробной терапии. Так, СПС, выделенные из одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* ингибировали не только процесс образования биоплёнки *E.coli*, но и эффективно растворяли уже сформировавшиеся

биоплёнки [37]. В настоящее время в числе работ, касающихся действия водорослевых СПС на био-плёнки бактерий, вызывающих диарею, немного, однако ввиду перспективности таких исследований, они, по-видимому, будут развиваться в следующие годы [38].

Одной из частых причин бактериальной диареи в последние годы является грамположительная анаэробная спорообразующая бактерия *Clostridium difficile* риботипов NAP1/B1/027 и ПЦРО78. Этот микроорганизм вызывает тяжёлое поражение кишечника, обозначаемое как псевдомембранозный колит. Позже это заболевание стали считать антибиотикоассоциированной диареей [39]. В настоящее время *C. difficile* рассматривается в качестве ведущей причины тяжёлых внутрибольничных диарей, широко распространённых в разных странах [40]. Основными факторами вирулентности этих микроорганизмов являются два экзотоксина — А и В [39]. Токсины возбудителя нарушают актиновый цитоскелет эпителиальных клеток кишечника путём гликозилирования белков из подсемейства Rho и Ras [41]. Токсин А вызывает разрушение слизистой оболочки, гибель эпителиальных клеток, воспаление и геморрагический энтерит, инфильтрацию лейкоцитами слизистой. При этом высвобождаются медиаторы воспаления. В эксперименте на мышах энтерит, вызванный токсином А, сопровождается увеличением количества жидкости в кишечнике, изменением соотношений объём/длина и масса/длина подвздошной петли и значительными патоморфологическими изменениями слизистой оболочки. Среди штаммов *C. difficile* много антибиотикостойчивых. Лечение часто не приносит результата, могут возникать рецидивы болезни, что требует разработки новых терапевтических стратегий, в том числе, использования сульфатированных полисахаридов водорослей. На модели энтерита у мышей, вызванного токсином А *C. difficile*, была определена эффективность фукоидана [42]. Фукоидан (Sigma. St. Louis, MO, USA) вводили в глазное сплетение (25 мг/кг) за 5 мин до инъекции 0,85% раствора NaCl или токсина (5 мкг), что в значительной степени предотвращало развитие симптомов, обусловленных токсином [42].

Системная обработка мышей фукоиданом значительно снижала увеличение массы/длины петли подвздошной кишки (опыт — $39,3 \pm 4,3$ мг/см, контроль — $58,9 \pm 3,9$ мг/см) и отношение объёма секрета к длине петли подвздошной кишки (опыт — $4,8 \pm 2,9$ мкл/см; контроль — $19,7 \pm 6,0$). Фукоидан предотвращал клеточную воспалительную инфильтрацию и разрушение слизистой оболочки, вызываемые токсином. Обработка мышей фукоиданом снижала активность токсин-индуцированной миелопероксидазы (маркера нейтрофильной инфильтрации) и аденозиндезаминазы (катализа-

тора необратимого дезаминирования) — маркеров воспалительной реакции — в ткани подвздошной кишки, что также являлось доказательством уменьшения степени инфильтрации слизистой оболочки и воспаления, вызываемого токсином. Полисахарид в этих экспериментах действовал в качестве лиганда для L-селектина — лектина, находящегося на поверхности лейкоцитов. Взаимодействие фукоидана и селектина ингибирует миграцию лейкоцитов — ранний и важный этап в процессе экстравазации лейкоцитов в участки воспаления [43]. Другой эффект фукоидана в данных экспериментах — модуляция барьерной функции и направления транспорта ионов и воды. В результате ингибирования миграции нейтрофилов фукоиданом может уменьшаться отёк подвздошной петли, что объясняет снижение величины соотношения массы/длины этого участка кишечника. Таким образом, при введении мышам токсина А *C. difficile* уменьшается инфильтрация лейкоцитами ткани, в результате блокады L-селектина снижаются индуцированные токсином секреция, отёк, а также разрушение слизистой.

На модели с применением токсина *V. cholerae* было установлено, что предварительное введение мышам агарана с сульфатом в положении C-6 остатков L-галактозы уменьшало общее количество фекалий, увеличивало активность Na^+/K^+ -АТФазы в кишечнике и снижало гастроинтестинальный транзит через антихолинергические механизмы [44]. Купирование диарейных нарушений позволило авторам позиционировать изученный полисахарид в качестве возможного кандидата для лечения диарейных заболеваний.

В качестве кандидата для разработки альтернативного средства для лечения острой секреторной диареи, вызванной холерным токсином, предложен также СПС из красной водоросли *Gracilaria caudata*. Профилактическая обработка швейцарских мышей полисахаридом (в дозах 10, 30 и 90 мг/кг) приводила после воздействия холерного токсина к уменьшению объёма фекалий и энтеропула (кишечной жидкости) и ослаблению других симптомов. Наиболее эффективной была доза 90 мг/кг [45]. Методом ELISA было показано, что полисахарид может взаимодействовать как с рецептором клеток GM1, так и с холерным токсином.

Аналогичные исследования были проведены F. Bezerra и соавт. [46] с СПС из другой красной водоросли — *Gracilaria cervicornis*. Результаты экспериментов были близкими с полученными D. Costa и соавт. [47]. Авторы обнаружили, что СПС не влиял на моторику ЖКТ, что свидетельствовало об ином, нежели у лоперамида (агониста периферических μ -опиоидных рецепторов, локализуемых в энтеральной нервной системе), механизме действия при диарее. Следует иметь в виду,

что применение лоперамида имеет серьёзные ограничения [48], фукоидан же практически безвреден [49]. При секреторной диарее полисахарид снижал секрецию кишечной жидкости и выделение хлорида тонкой кишкой, связывался с GM1 и/или токсином холеры и блокировал его взаимодействие с клеточной поверхностью энтероцитов.

Эта же группа авторов исследовала эффективность при экспериментальной диарее, вызванной холерным токсином, СПС из красной водоросли *Gracilaria intermedia*. Как и все предыдущие полисахариды из красных водорослей он купировал симптомы диареи, предотвращал потерю массы животными, взаимодействовал с GM1 рецептором и токсином холеры [50].

Доля диареи вирусной этиологии в этиологической структуре ОКИ варьирует от 25 до 50%. Среди выявленных вирусных агентов ОКИ наиболее распространёнными являются норо-, рота- и астровирусы [51, 52]. В литературе есть несколько сообщений, свидетельствующих о перспективности разработки этой проблемы.

Известно, что СПС специфически влияют на процесс адсорбции оболочечных вирусов [53]. Авторы сообщают об ингибировании каррагенаном репликации ретровирусов, герпесвирусов, поксвирусов, тогавирусов, парамиксовирусов и рабдовирусов. Позже появились сообщения, в которых представлены аналогичные и новые материалы по этому вопросу [54]. В них опровергается утверждение относительно отсутствия антиадгезионного действия ПС по отношению к оболочечным вирусам. Об этом же свидетельствуют материалы патента S. Anderson и соавт. [55], в котором авторами предложен способ ингибирования ротавирусной инфекции клеток человека путём обработки ротавируса сульфатированным полисахаридом. Наиболее эффективным агентом, ингибирующим клеточную ротавирусную инфекцию, был раствор лямбда-каррагинана для энтерального применения.

Сульфатированный рамнан из зелёной водоросли *Monostroma latissimum* обладал противовирусной активностью по отношению к энтеровирусу EV71, одному из возбудителей диареи, что было показано в тестах ингибирования цитопатического эффекта и уменьшения бляшкообразования. Полисахарид существенно ингибировал репликацию вируса, будучи добавлен до- или во время вирусной адсорбции, дозозависимо взаимодействуя с капсидным белком вируса VP1 и используя для подавления вирусной инфекции путь EGFR/PIK/Akt. В экспериментах *in vivo* полисахарид увеличивал выживаемость заражённых вирусом мышей и снижал титр вируса в их организме [56].

Как было сказано выше, возбудителями диареи могут быть не только бактерии и вирусы, но и паразиты, в частности, *Cryptosporidium parvum*

[57], вызывающий острую и кратковременную диарейную инфекцию. При этом больные, страдающие иммунодефицитом, испытывают гораздо более серьёзные симптомы (обильная водная диарея, обезвоживание) в ряде случаев со смертельным исходом. В развивающихся странах *C. parvum* является одним из главных агентов, вызывающих диарею, связанных с задержкой роста и высокой летальностью у детей [58].

Несмотря на такое широкое распространение криптоспориоза, варианты лечения его ограничены [59]. Нитазоксанид (NZT) разрешён только для лечения иммунокомпетентных лиц [60]. Средств для лечения иммунокомпрометированных людей и больных сельскохозяйственных животных нет, что диктует необходимость поиска новых эффективных средств против криптоспориоза. В связи с этим разработки природных лечебных и профилактических средств против этой инвазии можно считать весьма актуальными и перспективными.

С целью изучения влияния фукоидана из спорофилла бурой водоросли *U. pinnatifida* и его десульфатированного производного на адгезию криптоспоридий к клеткам кишечника были проведены эксперименты *in vitro* и *in vivo* [57]. В результате было установлено, что адгезия паразита к культуре клеток кишечника человека была значительно подавлена даже низкой дозой фукоидана (1 мкг/мл). *In vivo* показано, что фукоидан уменьшает число ооцист у новорождённых мышей. У животных, получивших десульфатированный фукоидан, заметного эффекта не было. Эти результаты свидетельствуют о том, что фукоидан способен эффективно ингибировать рост *C. parvum*. При этом сложный эфир сульфата фукоидана является активным центром, предотвращающим адгезию *C. parvum* к эпителиальным клеткам кишечника хозяина.

Другие полисахариды водорослей (ламинарин и альгинат) также положительно влияют на воспалительные процессы в кишечнике. Воздействие ламинарина включает в себя нормализацию интестинального метаболизма, состава слизи и pH секрета различных отделов ЖКТ [61]. Ламинин малотоксичен, не обладает антигенными и пирогенными свойствами [62]. Микрофлора кишечника *in vitro* использует ламинарин в качестве питательного субстрата. Через 24 ч он более чем на 90% используется кишечными бактериями человека. Под действием ламинарина у крыс в эксперименте наблюдалось изменение состава слизи в тощей, подвздошной, слепой и ободочной кишках. Из-за его влияния на состав слизи ламинарин может оказывать действие на адгезию и транслокацию бактерий через эпителиальный барьер кишечника. С. Deville и соавт. [61] полагают, что ламинарин является модулятором метаболиз-

ма в кишечнике благодаря его влиянию на состав слизи, pH в кишечнике и выработку короткоцепочечных жирных кислот, особенно бутирата.

Альгинаты бурых водорослей достаточно широко используются в виде БАД, гелей, капсул и пр. для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, в том числе при диарее [63, 64]. Альгиновая кислота нерастворима в воде, а её соли — альгинаты калия, натрия и магния хорошо растворимы в воде, образуя при этом вязкие растворы. Это свойство использовано, например, В. А. Солодким и др. [63], предложившими гидрогель на основе альгината натрия с димексидом для ректального применения пациентам с воспалением кишечника. Автор получил выраженный клинический эффект без побочных явлений, аллергических реакций и развития резистентности к лечению. Гель можно применять амбулаторно, отказаться от антибиотиков и гормональных препаратов. Препараты альгиновой кислоты оказывают нежное обволакивающее действие на слизистую кишечника, способствуя одновременно ослаблению патологических рефлексов, в том числе и болевых. Альгинат натрия, кроме того, уменьшает явления окислительного стресса в тканях кишечника [64].

Полисахариды ряда водорослей обладают пребиотическими свойствами и значительно влияют на кишечную микрофлору, что чрезвычайно важно для процесса выздоровления при диарее. Согласно последнему принятому определению, пребиотики являются субстратами, избирательно используемыми микроорганизмами-хозяевами, приносящими пользу здоровью [65]. При диарее значительную роль в исходе болезни играет состав микробиоты кишечника, стимуляция размножения полезных (бифидо-, лакто-) и ингибирование патогенных бактерий. Здоровая микробиота кишечника характеризуется преобладанием полезных видов микроорганизмов — *Firmicutes* и *Bacterioides* и небольшим количеством *Proteobacteria* и *Actinobacteria* [66]. При расстройстве кишечника в его содержимом развивается большое количество энтеробактерий, неблагоприятно действующих на эпителий кишечника и вызывающих воспаление.

Х. Chen и соавт. [67] исследовали пребиотическую активность ПС из 4 видов морских водорослей — *Grateloupia filicina* (GFP), *Eucheuma spinosum* (ESP), *Ulva pertusa* (UPP) и *Ascophyllum nodosum* (ANP). Полисахариды различались по общему содержанию сахара и сульфата, а также по моносахаридному составу. GFP и ESP значительно стимулировали пролиферацию бифидобактерий. Самые высокие показатели полезных бактерий были отмечены при действии 0,1% ESP и 0,4% GFP. Обращает на себя внимание тот факт, что два других полисахарида — UPP и ANP, наоборот, ингибировали рост полезной микрофлоры

при использовании всех протестированных концентраций (0,1–0,5%). Таким образом, полисахариды не всех водорослей могут быть использованы в качестве пребиотиков. Разное действие полисахаридов может быть связано с различиями в структуре и моносахаридном составе биополимеров.

Совсем недавно появилось интересное сообщение [68] о результатах ферментации *in vitro* полисахарида из красной водоросли *Gracillaria lemaneiformis*, 53,7% которого были использованы кишечной микробиотой, при этом М.м. соединения через 48 ч уменьшилась на 59,41%. Это позволило авторам позиционировать полисахарид в качестве потенциального пребиотика.

Роль противовоспалительных, иммуномодулирующих и антиоксидантных свойств водорослевых полисахаридов при инфекционной диарее

Известно, что полисахариды водорослей, особенно СПС, оказывают на макроорганизм сильное иммуномодулирующее действие, которое вносит значительный вклад в процесс купирования симптомов диареи у человека и животных.

М. Berri и соавт. [69] показали, что экстракт зелёной водоросли *Ulva armoricana*, основным компонентом которого был ульван, не только обеспечивал селективное ингибирование роста *Pasteurella multocida*, *S.aureus*, *Streptococcus suis*, *Enterococcus cecorum*, патогенов, вызывающих диарею, мастит, пневмонию у сельскохозяйственных животных и приводящих к высокой смертности скота и большим экономическим потерям, но и стимулировал иммунный ответ организма хозяина. Культура эпителиальных клеток кишечника свиньи (IPEC-1) *in vitro* имитирует пероральное поступление в организм ПС. Обработка полисахаридом этих клеток вызывала активацию и выделение IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , что свидетельствовало о том, что он может вызывать клеточно-опосредованный ответ. Было отмечено также усиление продукции гомеостатического хемокина CCL20, отвечающего за упорядоченное распределение лимфоидных и дендритных клеток во вторичных лимфоидных органах. Кроме того, возрастал уровень мРНК TGF β , что свидетельствовало о возможном воздействии полисахарида на воспалительный процесс в эпителиальной ткани кишечника.

Полисахарид усиливал также экспрессию PPAR γ , транскрипционного фактора, участвующего в иммунном ответе благодаря его способности ингибировать экспрессию воспалительных цитокинов и направлять дифференцировку иммунных клеток в сторону противовоспалительно-

го фенотипа [70]. Активация PPAR способствует подавлению различных механизмов иммунного воспаления через систему ядерного фактора κ -B. При этом уменьшается продукция провоспалительных цитокинов (IL-6, 8, 1 β , IFN γ , TNF α), молекулы адгезии VCAM-1, тормозится адгезия и миграция мононуклеаров в субэндотелий, реализуется провоспалительный потенциал эндотелия и продукция острофазовых белков [71].

Многочисленные исследования свидетельствуют о противовоспалительных потенциях СПС морских водорослей и их значении при различных инфекционных болезнях [49]. Плейотропное противовоспалительное действие СПС включает ингибирование селектинов [72], комплемента [73], провоспалительных цитокинов и хемокинов [74], а также ферментов, участвующих в разрушении тканей при воспалении, таких как гепараназы, эластазы и металлопротеиназы [75]. Противовоспалительные эффекты СПС обусловлены ингибированием ключевых сигнальных путей активации универсального ядерного фактора транскрипции NF- κ B [76, 77]. В составе экстрактов бурых водорослей обнаружены ингибиторы COX-2, iNOS, PGE-2, IL-6, TNF α , IL-1 β [78]. Свойством ингибировать высокий уровень COX-2 и NO обладают и СПС из этих гидробионтов [79]. Ингибирующий эффект сопровождается дозозависимым снижением экспрессии генов iNOS и COX-2. На культуре клеток эпителия кишечника мышей CMT-93 показано, что фукоиданы из водорослей *S. ocumuranus* и *Kjellmaniella crassifolia* ингибировали повышенную продукцию IL-6 [80]. У мышей с экспериментальным колитом, получивших фукоидан, снижался уровень IL-6, TGF β и миелопероксидазы, чего не наблюдалось у контрольных животных. Противовоспалительное действие отмечено практически для всех водорослей, их экстрактов и полученных из них полисахаридов. В связи с этим, можно полагать, что антидиарейный эффект СПС связан в значительной степени с противовоспалительными свойствами этих соединений, что доказательно представлено, например, в работе В. Liu и соавт. [21]. Авторы показали, что экспериментальная диарея у мышей сопровождалась выраженным воспалительным ответом с высоким уровнем секреции медиаторов воспаления. У животных, получавших СПС красной водоросли, уровень провоспалительных цитокинов (MCP-1, TNF α , IFN γ , IL-6) был значительно снижен.

Таким образом, полисахариды водорослей могут быть использованы в качестве хорошо переносимой, не обладающей нежелательными побочными явлениями поддерживающей терапии инфекционной диареи для уменьшения воспаления и сохранения целостности эпителия кишечника.

Возбудители инфекционной диареи индуцируют возникновение окислительного стресса в ор-

ганизме [81]. Во время воспалительного процесса при диарее клетки врождённого иммунитета усиливают продукцию токсичных для организма активных форм кислорода, что приводит к значительному повреждению слизистой оболочки кишечника [75]. СПС водорослей являются сильными антиоксидантами [82] и способны предупреждать развитие окислительного стресса в живых организмах или снижать его интенсивность [71, 83], что позволяет им вносить свой положительный вклад в благоприятный исход болезни.

Заключение

В литературе до настоящего времени немного материалов, освещающих терапевтические возможности полисахаридов из морских водорослей при диарее инфекционной природы. Кроме того, приводятся в основном только экспериментальные материалы. Оценка эффективности полисахаридов в клинических испытаниях затруднена ввиду отсутствия лекарственных препаратов на основе СПС водорослей, что связано с трудностями получения стандартизованных препаратов. В этой связи исследования *in vitro*, *ex vivo* и на животных являются ключевыми для оценки новых антидиарейных противомикробных водорослевых полисахаридов. Однако, учитывая прямое бактериостатическое и бактерицидное, антибиоплёночное действие этих соединений, их противовоспалительное, иммуномодулирующее, антиоксидантное и ранозаживляющее действие, а также имеющиеся в литературе результаты экспериментальных исследований, можно предполагать, что полисахариды морских водорослей могут быть хорошей основой для разработки антидиарейных препаратов, БАД к пище и продуктов диетического питания.

Исследования антимикробных и пребиотических свойств водорослевых полисахаридов отвечают интересам не только медицины, но и сельского хозяйства, поскольку диарея и гибель от неё часто регистрируются у молодняка при переходе от грудного к базовому вскармливанию. Так, А. Walsh и соавт. [84] показали, что добавление в корм ламинарина и фукоидана снижает вероятность развития диареи у поросят, отлученных от груди во время перехода от грудного вскармливания на другой тип питания. При этом у животных, получавших водорослевую добавку, был отмечен более низкий уровень экспрессии мРНК IL-6, IL-17 и IL-1 β по сравнению с группой контроля (не получавшие полисахариды поросята). Таким образом, добавление в рацион поросят полисахаридов бурых водорослей при переводе их на другой тип питания чрезвычайно полезны для профилактики воспалительных заболеваний ЖКТ, в том числе, диареи [85].

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Diarrhoeal disease. WorLd HeaLth Organization. Fact sheet No 330. 2013. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>
- Vos T., Barber R.M., BeLl B. et al. Global, regional, and nationaL incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 386 (9995): 743–800.
- Liu Y., Liu W., Wang Y. et al. Inhibitory effect of depolymerized sulfated galactans from marine red algae on the growth and adhesion of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Mar Drugs* 2019; 17 (12): 694.
- ВОЗ. Инфекционный бюллетень. 02.05.2017. / ВОЗ. Infektsionnyj byulleten'. 02.05.2017. [in Russian]
- Федеральная служба государственной статистики. Заболеваемость населения отдельными инфекционными заболеваниями в 2016 году (данные Роспотребнадзора). URL: b17_01/IssWWW.exe/Stg/d01/3-3.doc / Federal'naya sluzhba gosudarstvennoj statistiki. Zaboлеваemost' naseleniya ot del'nymi infektsionnymi zaboлеvaniyami v 2016 godu (dannye Rospotrebнадзора). URL: b17_01/IssWWW.exe/Stg/d01/3-3.doc [in Russian]
- Naghavi M., Wang H., Lozano R. et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 385 (9963): 117–171.
- Юшук Н.Д. Острая диарея у взрослых: актуальность, проблемы и новые возможности терапии. Инф. болезни: новости, мнения, обучение. — 2017. — № 4. — С. 99–107. / Jyushchuk N.D. Ostraya diareya u vzroslykh: aktual'nost', problemy i novye vozmozhnosti terapii. Inf Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie 2017; 4: 99–107.
- Farthing M.J. Diarrhoea: a significant worldwide problem. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14 (1): 65–69.
- Guarino A., Ashkenazi S., Gendrel D. et al. European society for pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition / European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the Management of acute Gastroenteritis in children in Europe: update 2014. *JPGN* 2014; 59: 132–152.
- Schiller L.R., Pardi D.S., Spiller R. 2013 APDW/WCOG Shanghai working party report: chronic diarrhea: definition, classification, diagnosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29 (1): 6–25.
- Белюсова Е.А., Никитина Н.В. Диарея: правильный алгоритм действий врача. Мед совет. — 2017. — № 15. — С. 130–139. / Belousova E.A., Nikitina N.V. Diareya: pravil'nyj algoritm dejstvij vracha. Med Sovet 2017; 15: 130–139. [in Russian]
- Белюсова Е.А., Златкина А.Р. Синдром диареи в практике гастроэнтеролога: патофизиология и дифференцированный подход к лечению. Фарматека. — 2003. — № 10. — С. 65–71. / Belousova E.A., Zlatkina A.R. Sindrom diarei v praktike gastroenterologa: patofiziologiya i differentsirovannyj podkhod k lecheniyu. Farmateka 2003; 10: 65–71. [in Russian]
- Dubreuil D.J. The whole Shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. *Curr Issues Mol Biol* 2012; 14: 71–82.
- Краснова У.И., Хохлова Н.И., Проворова В.В., Кузнецова В.Г. Острые кишечные инфекции у детей и возможности терапии с применением метабитиков. Лечащий врач. — 2017. — № 2. — С. 73. / Krasnova U.I., Khokhlova N.I., Provorova V.V., Kuznetsova V.G. Ostrye kishhechnye infektsii u detej i vozmozhnosti terapii s primeneniem metabiotikov. Lechashchij Vrach 2017; 2: 73. [in Russian]
- Navaneethan U., Gianella R.A. Mechanisms of infectious diarrhea. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology* 2008; 5 (11): 637–647.
- Glass R.I., Parashar U., Patel M. et al. The control of rotavirus gastroenteritis in the United States. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2012; 123: 36–53.
- Lanata C.F., Fisher-Walker C.L., Olascoaga A.C. et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One* 2013; 8 (9): e72788.
- Руженцова Т.А., Плоскирева А.А., Горелов А.В. Острая диарея бактериальной этиологии. Мед. совет. — 2016. — № 7. — С. 78–81. / Ruzhentsova T.A., Plaskireva A.A., Gorelov A.V. Ostraya diareya bakteri-al'noj etiologii. Med Sovet 2016; 7: 78–81. [in Russian]
- Holdt S.L., Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J Appl Phycol* 2011; 23 (3): 543–597.
- Шуляк Б.Ф. Энтерогеморрагические штаммы *E.coli* (обзор). Альманах клин. мед. — 2011. — № 25. — С. 72–76. / Shulyak B.F. Enterogemorrhagicheskie shtammy *E.coli* (obzor). Al'manakh Klin Med 2011; 25: 72–76. [in Russian]
- Liu B., Liu Q.-M., Li G.-L. et al. The anti-diarrhea activity of red algae originated sulfated polysaccharides on ETEC K-88 infected mice. *RSC Adv* 2019; 9: 2360–2370.
- Maciel S., Chaves L. S., Bws S. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydr Polym* 2008; 71: 559–565.
- Alsaedi F., Vaz D.P., Stones D.H., Krachler A.M. 3-Sulfogalactosyl-dependent adhesion of *Escherichia coli* HS multivalent adhesion molecule is attenuated by sulfatase activity. *J Biol Chem* 2017; 292: 19792–19803.
- Liu Q.M., Xu S. S., Li L. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydr Polym* 2017; 165: 189–196.
- Hwang P.-A., Hung Y.-L., Lin Y.-C. et al. The *in vitro* effects of the low molecular weight fucoidan on the bone osteogenic differentiation properties. *Cytotechnology* 2016; 68 (4): 1349–1359.
- Palanisami S., Vinosha M., Rajasekar P. et al. Antibacterial efficacy of a fucoidan fraction (Fu-F2) extracted from *Sargassum polycistum*. *Int J of Biol Macromol* 2019; 125 (15): 485–495.
- Gut A.M., Vasiljevic T., Yeager T., Donkor O.N. Salmonella infection-prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: A review. *Microbiology* 2018; 164: 1327–1344.
- Chua E.G., Ferbrughe 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.
- Krachler A.M., Ham H., Orth K. Outer membrane adhesion factor multi-valent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108 (28): 11614–11629.
- De Jesus Raposo M.F., de Moraes A.M.M.B., de Moraes R.M.S.C. Bioactivity and Applications of polysaccharides from marine microalgae. In: Merillon J.-M., Ramawat K.G., editors. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Springer; Cham, Switzerland: 2014.
- Vjasyabaskar P., Vaseela N., Thirumaran G. Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. *Chinese J Nat Med* 2012; 10 (6): 421–428.
- Jun J.-Y., Jung M.-J., Jeong I.-H. et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of sulfated polysaccharides from marine algae against dental plaque bacteria. *Mar Drugs* 2018; 16 (9): 301.
- Parks Q.M., Young R.L., Poch K.R. et al. Neutrophil enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: human F-actin and DNA as targets for therapy. *J Med Microbiol* 2009; 58 (Pt4): 492–502.
- Beloin C., Roux A., Ghigo J.-M. *Escherichia coli* biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 2008; 322: 249–289.
- O'Gara J.P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 270: 179–188.
- Solano C., Garcia B., Valle J. et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 2002; 43: 793–808.
- Vishwakarma J., Vavilala S.L. Evaluating the antibacterial and antibiofilm potential of sulfated polysaccharides extracted from green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Microbiol* 2019; 127 (4): 1004–1017.
- Busetti A., Shaw G., Megaw J., Gorman S.P., Maggs C.A., and Gilmore B.F. Marine-derived quorum-sensing inhibitory activities enhance the antibacterial efficacy of tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Mar Drugs* 2014; 13: 1–28.
- Гюлазян Н.М., Белая О.Ф., Малов В.А., Пак С.Г. Токсины А и В *C. difficile* глазами клинициста. Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2013. — № 6. — С. 42–48. / Gylazyan N.M., Belaya O.F., Malov V.A., Pak S.G. Toksiny A i V *C. difficile* glazami klinitsista. Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni 2013; 6: 42–48. [in Russian]
- Powell N., Jung S., Krishnan B. *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease: a marker for disease extent? *Gut* 2008; 57: 1183–1184.
- Just I., Wilms M., Selzer J. et al. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA). *Lancet* 1995; 357: 1777–1789.
- Barreto A.R., Cavalcante I.C., Castro M.V. et al. Fucoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A-induced ileal enteritis in mice. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 990–996.
- Parkin J., Cohen B. An overview of the immune system monoglycosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* 2001; 270: 13932–13936.
- Leydido A.C.M., Costa L.E.C., Araujo, T.S.L., Costa, D.S., Sousa N.A., Souza L.K.M., Sousa F.B.M., Filho M.D.S., Vasconcelos D.F.P., Silva F.R.P. Anti-diarrhoeal therapeutic potential and safety assessment of sulphated polysaccharide fraction from *Gracilaria intermedia* seaweed in mice. *Int J Biol Macromol* 2017; 97: 34–45.
- Sousa N.A.; Barros F.C.N.; Araujo T.S.L. et al. The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents. *Int J Biol Macromol* 2016; 86: 865–875.
- Bezerra F.F., Lima G.C., de Sousa W.M. et al. Antidiarrheal activity of a novel sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cervicornis*. *J Ethnopharmacol* 2018; 224: 27–35.
- Costa D.S., Araujo T.S., Sousa N.A. et al. Sulfated polysaccharide isolated from the seaweed *Gracilaria caudata* exerts an antidiarrhoeal effect in rodents. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016; 118 (6): 440–448.
- Kreisl W.C., Liow J.S., Kimura N., Seneca N. et al. P-glycoprotein function at the blood-brain barrier in humans can be quantified with the substrate radiotracer 11 C-N-desmethyl-loperamide. *J Nucl Med* 2010; 51 (4): 559–566.

49. Fitton J.H. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Mar Drugs* 2011; 9 (10): 1731–1760.
50. Araújo I.W.F., Chaves H.V., Pacheco J.M. et al. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria Filiformis* in induced temporomandibular joint pain. *Int Immunopharmacol* 2017; 44: 160–167.
51. Agyes M.M. WHO global rotavirus surveillance network: a strategic review of the first 5 years, 2008–2012. *Morb Mortal Wkly Rep* 2014; 63 (29): 634–637.
52. Ahmed S.M. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014; 14 (8): 725–730.
53. Witvrouw M., De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algal as potential antiviral drugs. *Gen Pharmacol* 1997; 29 (4): 497–511.
54. Damonte E.B., Matulewicz M.C., Cerezo A.S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curt Med Chem* 2004; 11 (18): 2399–2419.
55. Anderson S.N., Schaller J.P., Mazer T.B., Kirchner S.J. Method for inhibition of rotavirus infection with carrageenan. Patent US 5658893. 19.08.1997.
56. Wang S., Wang W., Hao C., Yu Y. Antiviral activity against enterovirus 71 of sulfated rhamnan isolated from the green alga *Monostroma latissimum*. *Carbohydr Polym* 2018; 200: 43–53.
57. Maruyama H., Tanaka M., Inoue M., Hashimoto M. The suppressive effect of Mekabu fucoidan on an attachment of *Cryptosporidium parvum* oocysts to the intestinal epithelial cells in neonatal mice. *Life Sciences* 2007; 80 (8): 775–781.
58. Mmbaga B.T., Houpt E.R. *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children: a review. *Pediatr Clin Am* 2017; 64: 837–850.
59. Bessoff K., Sateriale A., Lee K.K., Huston C.D. Drug repurposing screen reveals FDA-approved inhibitors of human HMG-CoA reductase and isoprenoid synthesis that block *Cryptosporidium parvum* growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 1804–1814.
60. Chavez M.A., White A.C.J. Novel treatment strategies and drugs in development for cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 2018; 16 (8): 655–661.
61. Deville C., Gharbi M., Dandrisse G., Peulen O. Study on the effects of laminarin a polysaccharide from seaweed, on gut characteristics. *J Sci Food Agric* 2007; 87 (9): 1717–1725.
62. Струсовская О.Г., Буюклинская О.В. Возможности использования ламинарина в медицине. Экология человека. — 2009. — № 11. — С. 33–36. / Strusovskaya O.G., Buiyuklinskaya O.V. Vozmozhnosti ispol'zovaniya laminarina v meditsine. *Ekologiya Cheloveka* 2009; 11: 33–36. [in Russian]
63. Солодкий В.А., Павлов А.Ю., Клименко К.А. и др. Способ лечения хронических воспалительных заболеваний толстого кишечника. Патент RU2431489C1. Дата публикации 20.10.2011. / Solodkiy V.A., Pavlov A.Yu., Klimenko K.A. i dr. Sposob lecheniya khronicheskikh vospalitel'nykh zabolevaniy tolstogo kishchechnika. Patent RU2431489S1. Data publikatsii 20.10.2011. [in Russian]
64. Esiringy F., Tugcu-Demiroz F., Acarturk F. et al. Investigation of the effect of intracolonic melatonin gel formulation on acetic acid-induced colitis. *Drug Deliv* 2016; 23 (7): 2318–2326.
65. Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E. et al. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement in the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14 (8): 491–502.
66. Sghir A., Gramet G., Suan A. et al. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2263–2266.
67. Chen X., Sun Y., Hu L. et al. *In vitro* prebiotic effects of seaweed polysaccharides. *J of Oceanology and Limnology* 2018; 36: 926–932.
68. Han R., Pang D., Wen L. et al. *In vitro* digestibility and prebiotic activities of a sulfated polysaccharide from *Gracillaria lemaneiformis*. *J Funct Foods* 2020; 64: 103652.
69. Berri M., Collen P.N. Green algal sulfated polysaccharides: a natural alternative to antibiotics via modulation of the intestinal immune response. 2 Int. Symposium on Alternatives to Antibiotics (ATA) 2016. Paris. France.
70. Tyagi S., Gupta P., Saini A.S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2011; 2 (4): 236–240.
71. Xu X.R., Carrim N., Ni H. et al. Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and antithrombotic therapies. *Thromb J* 2016; 14 (Suppl.1): 29.
72. Patel S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *Biotech* 2012; 2 (3): 171–185.
73. Jin W., Zhang W., Liang H. et al. The structure-activity relationship between algal polysaccharides and anti-complement activity. *Mar Drugs* 2016; 14 (1): 3.
74. Barbosa J. da Silva, Costa M.S.S.P., Rocha H.A.O. et al. *In vitro* immunostimulating activity of sulfated polysaccharides from *Caulerpa cupressoides* var. *Flabellata*. *Mar Drugs* 2019; 17 (2): 105.
75. Manlusok J.K.T., Hsieh C-L., Hsieh C-Y. et al. Pharmacologic application potentials of sulfated polysaccharide from marine algae. *Polymers (Basel)* 2019; 11 (7): 1163.
76. Park H.Y., Park H.M., Han M.H. et al. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF- κ B, MAPK and Act activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food Chem Toxicol* 2011; 49 (8): 1745–1752.
77. Wu G-J., Shiu S-M., Tsai G-J. et al. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaefolium*. *Food Hydrocol* 2016; 53: 16–23.
78. Sanjeeva K.K., Fernando I.P., Kim E.A. et al. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of brown seaweed *Sargassum horneri* in RAW264.7 cells. *Nutr Res Pract* 2017; 11 (1): 3–10.
79. Saraswati, Girivono P.E., Andarwulan N. et al. *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.
80. Matsumoto S., Nagaoka M., Hara T. et al. Fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* Tokida ameliorates murine chronic colitis through the down-regulation of interleukin-6 production on colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2004; 163 (3): 432–439.
81. Копачевская К.А., Молочный В.П. Состояние бактерицидной функции нейтрофильных лейкоцитов при острых кишечных инфекциях у детей. Дальневосточный мед журн. — 2015. — № 2. — С. 144–149. / Kopachevskaya K.A., Molochnyy V.P. Sostoyanie bakteritsidnoy funktsii neitrofil'nykh lejokositov pri ostrykh kishhechnykh infektsiyakh u detej. *Dal'nevostochny Med Zhurn* 2015; 2: 144–149.
82. Ajisaka K., Yokoyama T., Matsuo K. Structural characteristics and antioxidant activities of fucoidans from five brown seaweeds. *J. of Applied Glycoscience* 2016; 63 (2): 31–37.
83. Presa F.B., Marques M.L.M., Rocha H.A.O. The protective role of sulfated polysaccharides from green seaweed *Ulva lactuca* in cells exposed to oxidative damage. *Mar Drugs* 2018; 16 (4): 135.
84. Walsh A.M., Sweeney T., O'Shea C.J. et al. Effect of supplementing dietary laminarin and fucoidan on intestinal morphology and the immune gene expression in the weaned pig. *J Anim Sci* 2013; 90 (Suppl 4): 284–286.
85. Corino C., Modina S.C., Giancamillo A.D. et al. Seaweeds in pig nutrition. *Animals* 2019; 9: 1126.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

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

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

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

Гусева Людмила Григорьевна — главный врач Медицинского объединения ДВО РАН, Владивосток

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

Рифаксимин-альфа и другие кристаллические формы рифаксимины: есть ли отличия?

С. К. ЗЫРЯНОВ, *Е. А. БАЙБУЛАТОВА

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Rifaximin-Alpha and Other Crystalline Forms of Rifaximin: Are There Any Differences?

S. K. ZYRYANOV, *E. A. BAYBULATOVA

RUDN University, Moscow

Рифаксимин — антибиотик, для которого характерен полиморфизм. У рифаксимины существуют различные кристаллические формы с разными фармакологическими характеристиками. Рифаксимин действует локально в пищеварительном тракте, поэтому важно, чтобы его абсорбция была минимальной, а концентрация в просвете кишечника высокой. Абсорбция в кишечнике других кристаллических форм рифаксимины более значима по сравнению с рифаксимин-α (Альфа Нормикс®). Различия в фармакокинетике кристаллических форм рифаксимины могут влиять на его эффективность и безопасность, особенно у пациентов с хроническими заболеваниями (состояние иммунодефицита и в условиях «leaky gut» на фоне цирроза печени), которым требуются длительные курсы терапии. Рифаксимин-α (Альфа Нормикс®) обладает уникальным действием, так как кроме местного антибактериального действия демонстрирует эубиотический эффект и обладает противовоспалительными свойствами. Учитывая разнообразные механизмы действия, рифаксимин-α положительно модулирует микробиоту кишечника.

Ключевые слова: полиморфизм, рифаксимин-α, растворимость, биодоступность, антибиотик местного действия, синдром раздраженного кишечника (СРК), синдром избыточного бактериального роста (СИБР), симптоматическая неосложнённая дивертикулярная болезнь (СНДБ), диарея путешественников, печёночная энцефалопатия.

Rifaximin is an antibiotic characterized by polymorphism. It has various crystalline forms with different pharmacological characteristics. Rifaximin acts locally in the digestive tract, therefore it is important for the absorption to be minimal and for concentration in the intestinal lumen to be high. The absorption of other crystalline forms of rifaximin in the intestine is greater than that of rifaximin-α (Alpha Normix®). Differences in pharmacokinetics of the crystalline forms of rifaximin may affect its effectiveness and safety, especially in patients with chronic diseases (immunodeficiency and leaky gut against the background of liver cirrhosis) who require long courses of therapy. Rifaximin-α (Alpha Normix®) is unique as it has eubiotic and anti-inflammatory properties in addition to local antibacterial effect. Given its diverse mechanisms of action, rifaximin-α positively modulates gut microbiota.

Keywords: polymorphism, rifaximin-α, solubility, bioavailability, local antibiotic, irritable bowel syndrome (IBS); bacterial overgrowth syndrome (BOS); symptomatic uncomplicated diverticular disease (SUDD), traveler's diarrhea, hepatic encephalopathy.

Введение

В 2008 г. в России появился новый невсасывающийся (кишечный) антибактериальный препарат Альфа Нормикс® (рифаксимин-α). Это полусинтетический антибиотик, относящийся к группе рифампицина. Он был получен в результате экспериментального синтеза в 1982 г. компанией «Alfa Wassermann SpA» (Bologna, Италия).

Рифаксимин-α является пероральным антибиотиком широкого спектра действия с антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных аэробных и ана-

эробных бактерий. Он практически не всасывается в ЖКТ и поэтому имеет очень благоприятный профиль безопасности. Доказано, что рифаксимин-α эффективен при лечении диареи путешественников, синдрома раздражённого кишечника, синдрома избыточного роста микроорганизмов в кишечнике и печёночной энцефалопатии. Кроме того, имеются доказательства положительного эффекта рифаксимины-α в лечении симптоматической неосложнённой дивертикулезной болезни (СНДБ) и в профилактике рецидивирующего дивертикулита. Развитие лекарственной устойчивости во время терапии рифаксимин-α маловероятно из-за минимальной системной абсорбции и ограниченной перекрёстной резистентности рифаксимины-α с другими анти-

© С. К. Зырянов, Е. А. Байбулатова, 2020

*Адрес для корреспонденции: E-mail: baybulatova-ea@rudn.ru

микробными средствами. В этом обзоре рассматривается роль рифаксимины- α в лечении желудочно-кишечных заболеваний и влияние кристаллической формы рифаксимины на эффективность и безопасность терапии.

1. Терапевтический эффект рифаксимины зависит от его кристаллической формы

Многие химические соединения обладают полиморфизмом. Полиморфизм — это способность вещества в твёрдом состоянии существовать в различных кристаллических формах при одном и том же химическом составе. Химические и физические свойства кристаллических форм, включая растворимость, могут различаться, что может существенно повлиять на всасывание *in vivo*. Это особенно важно для фармацевтических препаратов, так как может повлиять на эффективность и безопасность лекарственных средств [1].

Рифаксимин (4-дезоксид-4'-метилпиридо[1',2'-1,2]имидазо-[5,4-с]рифамидин SV) является полусинтетическим антибиотиком [2] местного действия с широким спектром, включающим грамположительные и грамотрицательные аэробные и анаэробные организмы [3–9], для которого характерен полиморфизм (табл. 1).

Таблица 1. Активность рифаксимины- α *in vitro* [10]

Грамположительные микроорганизмы	Грамотрицательные микроорганизмы
Аэробные	
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Shigella</i> spp.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Streptococcus epidermidis</i>	<i>Proteus</i> spp.
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Peptococcus</i> spp.
	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
	<i>Vibrio cholerae</i>
Анаэробные	
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Peptococcus</i> spp.	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	

Механизм действия рифаксимины обусловлен необратимым связыванием бета-субъединицы фермента бактерий, ДНК-зависимой РНК-полимеразы, что приводит к ингибированию синтеза РНК и белков бактерий. Препарат оказывает бактерицидное действие в отношении чувствительных микроорганизмов.

Существуют более 10 кристаллических форм рифаксимины, наиболее часто описываемые из которых — α , β , γ , ϵ , σ . В дополнение к кристаллическим формам, существует также аморфная форма рифаксимины. Аморфная форма состоит из неупорядоченных молекулярных структур и не имеет кристаллической решетки [11, 12].

Исследования *in vitro* показали разную скорость растворения и растворимость этих кристаллических форм, а исследования *in vivo* на собаках выявили значительные различия в их фармакокинетическом профиле [13].

2. Кристаллическая α форма рифаксимины обеспечивает минимальное всасывание в просвете ЖКТ

Различные химико-физические свойства кристаллических форм (стабильность, химическая реактивность, скорость растворения и растворимость) могут значительно изменить биодоступность каждой молекулы, тем самым влияя на её фармакокинетические и фармакодинамические свойства [14].

Исследование на собаках показало низкое системное всасывание кристаллических форм α и β , при этом всасывание рифаксимины ϵ было в шесть раз выше, а всасывание рифаксимины γ в 400 раз выше (рис. 1) [13]. α -, β - и ϵ -формы демонстрируют незначительное всасывание и, сле-

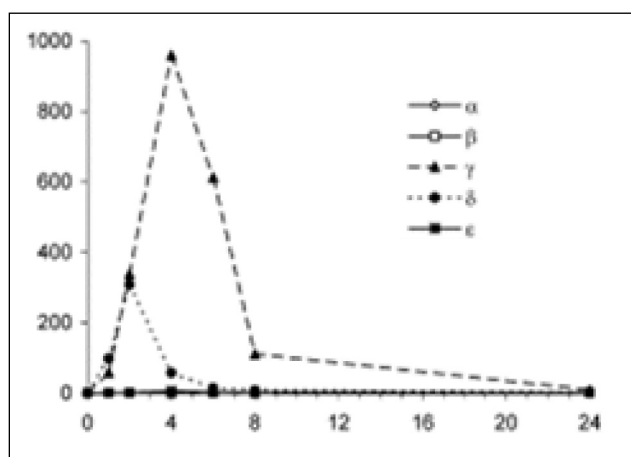


Рис. 1. Средний профиль концентрации-времени рифаксимины α -, β -, γ -, δ - и ϵ -формы после приема внутрь 100 мг кг^{-1} у четырех собак [13].

довательно, оказывают местное действие в желудочно-кишечном тракте, что обеспечивает превосходную переносимость. С другой стороны, δ -форма и, в особенности, γ -форма демонстрируют высокую биодоступность, более характерную для препаратов системного действия. Если любая из кристаллических форм рифаксимины будет обладать высокой степенью всасывания в ЖКТ и высокой биодоступностью, то существует риск потенциальной селекции бактериальных штаммов, устойчивых к рифаксимины.

Средние фармакокинетические параметры пяти кристаллических форм представлены в табл. 2.

Наличие среди них штаммов *Mycobacterium tuberculosis* может привести к развитию перекрё-

Таблица 2. Исследование биодоступности кристаллических форм рифаксими́на у собак. Среднее $\pm$ СОС фармакокинетических параметров после перорального введения 100 мг кг⁻¹ (n=4) [13]

Форма рифаксими́на	$C_{\max}^a$ нг мл ⁻¹	$t_{\max}^b$ ч	AUC_{0-24}^c нг ч мл ⁻¹	$AUC_{0-\infty}^d$ нг ч мл ⁻¹
α	2,6 $\pm$ 0,7	4	17 $\pm$ 7	17 $\pm$ 7
β	1,1 $\pm$ 0,6	4	10 $\pm$ 7	12 $\pm$ 8
γ	1085,1 $\pm$ 78,7	2	4795 $\pm$ 4120	4894 $\pm$ 4107
δ	308,3 $\pm$ 224,1	2	801 $\pm$ 517	830 $\pm$ 515
ϵ	6,9 $\pm$ 5,1	4	42 $\pm$ 35	77 $\pm$ 42

Примечание. ^a — максимальная наблюдаемая концентрация в плазме крови; ^b — время с момента введения до достижения $C_{\max}$; значения представлены как медианы; ^c — площадь под кривой «концентрация-время» от момента введения препарата до последнего отбора образца (через 24 ч после введения препарата); ^d — площадь под кривой «концентрация-время» с экстраполяцией до бесконечности.

стойкой устойчивости к рифампицину, соединению того же класса, что и рифаксимин, которое широко используется в комбинации с другими препаратами для лечения туберкулёза [15, 16].

Рифаксимин- α продемонстрировал очень высокую степень безопасности, даже при непрерывном приёме (в стандартных терапевтических дозах) в течение 6 мес., а его минимальное системное всасывание (не более 1%) или отсутствие системного всасывания объясняют профиль нежелательных явлений, соответствующий профилю плацебо. После перорального приёма концентрация рифаксими́на- α в плазме очень низкая (менее 10 нг/мл) не только у здоровых людей, но и у пациентов с повреждённой слизистой оболочкой кишечника [17, 18].

Минимальное всасывание α -формы рифаксими́на в плазму крови снижает риск системных побочных эффектов, внекишечных лекарственных взаимодействий с другими препаратами, а у пациентов с заболеваниями печени и почек нет необходимости в коррекции дозы [17]. Использование других кристаллических форм или аморфной формы рифаксими́на с более высоким и часто непредсказуемым всасыванием не может гарантировать хорошую переносимость препарата. Этот вопрос наиболее важен для хронических пациентов, кому требуются длительные курсы терапии, особенно на фоне иммунодефицитных состояний и в условиях «leaky gut» (цирроз печени) [19].

3. Рифаксимин- α создает высокую концентрацию действующего вещества в просвете кишечника

Эффективность терапии рифаксими́ном- α определяется высокой степенью концентрации препарата в просвете кишечника, которая составляет около 8000 мкг/мл через три дня терапии в дозе 800 мг/день [20]. Данная концентрация необходи-

ма для получения антимикробного эффекта в отношении большей части энтеропатогенных бактерий [21]. Терапия бактериологического поражения кишечника является примером того, как применение максимальной дозы препарата способствует лучшему терапевтическому эффекту [22].

У антибиотика с низким всасыванием, предназначенного для местного антимикробного действия (т. е. действия в желудочно-кишечном тракте), системное всасывание может привести к снижению местной биодоступности и возможно-му развитию системных побочных эффектов [23].

4. Рифаксимин- α характеризуется отсутствием бактериальной резистентности [24]

Антибактериальную активность *in vitro* оценивают, определяя минимальную подавляющую концентрацию (МПК) препарата против бактерий клинических штаммов.

Концентрация рифаксими́на- α в ЖКТ значительно превышает МПК. Например, содержание препарата в фекалиях после перорального приёма варьирует от 4000 до 8000 мкг/г стула, что в 160–250 раз выше МПК₉₀ для различных возбудителей кишечных инфекций [18].

Возможное развитие устойчивости к рифаксими́ну- α обусловлено пошаговой перестройкой хромосомы в области локализации гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Формирование устойчивости вследствие хромосомального механизма — более редкое явление, чем опосредованный плазмидами перенос [18]. Развитие устойчивости к рифаксими́ну- α детально изучено на нескольких аэробных (грамотрицательных и грамположительных) и анаэробных штаммах. Спонтанный (самостоятельный) отбор устойчивых штаммов среди анаэробов наблюдали редко: только у нескольких видов анаэробов отмечено спонтанное возникновение устойчивых мутантных штаммов [18]. Устойчивые к рифаксими́ну- α аэробные грамположительные кокки легче формируются в аэробных, чем в анаэробных условиях [18]. По сравнению с грамположительными, грамотрицательные бактерии с лекарственной устойчивостью образовывались реже [18], поскольку анаэробная среда затрудняет отбор рифаксими́ноустойчивых энтеробактерий, можно предположить, что во время терапии данным препаратом вероятность появления резистентных штаммов в ЖКТ (преимущественно анаэробная среда) невысока. Таким образом, возникновение устойчивых к рифаксими́ну- α бактерий *in vivo* должно быть достаточно редким феноменом.

Частота развития резистентности у штаммов *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium* и анаэробных кокков после короткого курса (5 дней) терапии антибиотиком (800 мг/сут)

достигает 30–90% [18]. Аналогичные результаты наблюдали после окончания терапии у 10 пациентов с печёночной энцефалопатией, которые получали рифаксимин- α в дозе 1200 мг/сут в течение 5 дней [18]. Впрочем, после завершения терапии наблюдали исчезновение устойчивости бактерий (рис. 2), хотя скорость этого процесса у разных микроорганизмов существенно варьировала. У аэробных бактерий резистентность исчезала быстро, тогда как анаэробные бактерии, особенно грамотрицательные палочки, приобретали чувствительность к рифаксими- α медленно. Тем не менее, через 3 мес. после окончания терапии устойчивых штаммов в испражнениях не обнаруживали [18]. Следует подчеркнуть, что при ультракоротком курсе терапии антибиотиком, принятом для лечения диареи путешественников, риск появления устойчивых штаммов очень мал [18].

5. Рифаксимин- α обладает дополнительными свойствами, которые усиливают его антибактериальное действие

- *Предотвращает транслокацию бактерий из кишечника [25, 26]*

Борьба с бактериальной транслокацией нередко оказывается более значимым в клиническом аспекте методом борьбы с печёночной энцефалопатией, нежели традиционные методы лечения.

К дополнительным факторам, влияющим на транслокацию бактерий, относится кишечное воспаление и изменения системы иммунного надзора кишечника. Так, у пациентов с циррозом печени имеется воспаление двенадцатиперстной кишки, что может способствовать повышенной кишечной проницаемости [27, 28]. У крыс с циррозом печени в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника и брыжеечных лимфатических узлах увеличено количество активированных дендритных клеток CD103+, сочетающиеся с определяемой бактериальной ДНК, но при отсутствии жизнеспособных бактерий в брыжеечных лимфатических узлах. В то же время у крыс с жизнеспособными бактериями в брыжеечных лимфатических узлах дендритные клетки CD103+ не активированы, что свидетельствует о толерантности и истощении. Действуя внутри кишечника, рифаксимин- α предотвращает транслокацию бактерий и снижает активацию и функционирование дендритных клеток CD103+, что свидетельствует о том, что бактериальная транслокация связана скорее с кишечной микробиотой, чем с организмом «хозяина» [29].

Хотя кишечная микробиота участвует в развитии заболевания печени ещё на этапе, предшествующем циррозу печени, патологические функции кишечной микробиоты изменяются и

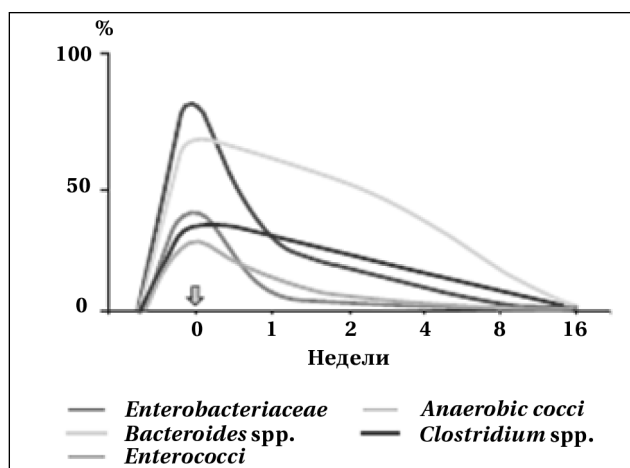


Рис. 2. Исчезновение устойчивых к рифаксими- α бактерий из кишечника человека после прекращения лечения этим антибиотиком (неделя 0) [18].

По оси абсцисс указано время (недели) после отмены препарата.

на последующих этапах его развития. Транслоцируемые жизнеспособные бактерии и продукты жизнедеятельности микроорганизмов играют важную роль в развитии клинических осложнений, ассоциированных с терминальной стадией болезни печени. Решающим фактором смертности данной группы пациентов может оказаться транслокация бактерий, а не дисфункция печени.

- *Препятствует прикреплению бактерий к слизистой кишечника [25, 30]*

Рифаксимин- α влияет на физиологию эпителиальных клеток, что выражается в изменении инвазивной способности кишечных патогенов и воспаления, и даёт основание предполагать, что рифаксимин- α оказывает цитопротективный эффект против бактериальной колонизации и инфекции [31].

Предварительная обработка рифаксимином- α энтероаггативной *E.coli* приводит к снижению бактериальной адгезии к эпителиальным клеткам (HEp-2 (гортань)) без влияния на их жизнеспособность. Этот механизм, вероятно, включает прямые рифаксимин-опосредованные изменения клеток HEp-2, которые, в свою очередь, влияют на бактериальную адгезию (прямо, косвенно или и то, и другое). Кроме того, наблюдение зависимости эффектов от времени и концентрации позволило предположить, что опосредованный рифаксимином- α процесс изменяет клеточные параметры, важные для прикрепления энтероаггативной *E.coli*. Снижение барьерной адгезии может частично объяснить благотворное действие рифаксими- α при желудочно-кишечных заболеваниях.

- *Оказывает эубиотическое действие [32]*

Хотя рифаксимин- α обладает антибактериальными свойствами, он оказывает минимальное отрицательное влияние на общую микробиоту ки-

шечника. Кроме того, препарат продемонстрировал эубиотический эффект, поскольку он стимулирует рост полезных видов бактерий, в том числе лактобацилл и бифидобактерий (рис. 3) [32, 33].

Рифаксимин- α , в моделях *in vitro* или *ex vivo* и у человека приводит к увеличению «здоровых бактерий» и изменению состава бактериальных метаболитов в кишечнике [34].

В исследованиях на пациентах с печёночной энцефалопатией было показано, что рифаксимин- α снижает эндотоксемию, уровни вторичных желчных кислот и вредных метаболитов, которые были положительно коррелированы с *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Porphyromonadaceae*, несмотря на умеренное изменение состава микробиоты стула [35–37].

J. Bajaj и соавт. [35] не обнаружили существенных изменений в микробиоте до и после лечения рифаксимином- α , но наблюдалось снижение таксонов *Veillonellaceae* и тенденция к увеличению *Eubacteriaceae*.

D. Xu и соавт. [38] в двух моделях висцеральной гиперальгезии животных, имитирующих воспалительное заболевание кишечника, показали, что рифаксимин- α после перорального введения крысам приводит к росту лактобацилл и значительному снижению содержания *Clostridiaceae*, *Erysipelothrichaceae* и *Peptostreptococcaceae*.

Кроме того, в непрерывной культуре кишечной модели, колонизированной фекальной микробиотой пациентов, страдающих болезнью Крона, рифаксимин- α не влиял на разнообразие микробиоты кишечника, вызывая при этом увеличение количества «здоровых бактерий», таких как *Bifidobacterium*, *Atopobium* и *Faecalibacterium prausnitzii* [34]. Наблюдался также сдвиг в микробном метаболизме, о чём свидетельствует увеличение содержания короткоцепочечных жирных кислот, пропанола, деканола, неанона и ароматических органических соединений, а также снижение содержания этанола, метанола и глутамата.

• **Проявляет противовоспалительную активность [39]**

Рифаксимин- α также продемонстрировал хорошие противовоспалительные свойства [39]. В частности, он подавлял кишечное и системное воспаление за счёт сохранения эпителиальной функции (например, ограничения бактериальной транслокации), а также за счёт прямой противовоспалительной активности. Было показано, что субингибирующие концентрации рифаксимины- α изменяют профиль экспрессии цитокинов (например, снижение уровня интерлейкина-8 и матриксной металлопротеиназы-9) [40].

Рифаксимин- α является агонистом кишечник-специфического рецептора человека — прегнан X рецептор (PXR). Недавние исследования на мышах дали представление о новой функции

для прегнан X рецептора при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК). Механизм защитного действия активации прегнан X рецептора при ВЗК до конца не выяснен, но частично обусловлен ослаблением сигнального действия ядерного фактора NF- κ B, что приводит к снижению экспрессии таких провоспалительных цитокинов, как интерлейкины (ИЛ-10, ИЛ-1 β) и фактор некроза опухоли- α . Таким образом, прегнан X рецептор может быть новой мишенью для терапии ВЗК, и потенциальная терапевтическая ценность рифаксимины- α при ВЗК может быть частично обусловлена его свойствами активации прегнан X рецептора [41].

Эффективность рифаксимины- α в снижении передачи сигналов NF- κ B PXR-зависимым образом продемонстрирована в первичных эпителиальных клетках толстой кишки человека, а также в биоптатах толстой кишки человека [42].

Профилактическая и терапевтическая роль рифаксимины- α в экспериментальных моделях ВЗК была также продемонстрирована на PXR-гуманизированных мышах, где рифаксимин- α не только предотвращал ВЗК до воспалительного ответа, но и уменьшал симптомы после начала колита [43].

J. Терс и соавт. [44] представили доказательства того, что PXR-агонисты могут усиливать заживление ран в монослоях эпителиальных клеток кишечника за счёт активации p38 MAP киназы-зависимой миграции клеток. Заживление ран, вызванное агонистами PXR, происходит при отсутствии повышенной пролиферации клеток.

• **Снижает вирулентность бактерий [25]**

На фоне применения рифаксимины- α отмечается модификация вирулентности энтеротоксигенных штаммов кишечной палочки.

Рифаксимин- α мало влияет на снижение бактериальной нагрузки как грамположительной, так и грамотрицательной флоры толстой кишки. В клинических испытаниях по диарее путешественников рифаксимин- α показал низкую скорость эрадикации патогена из образцов стула, но при этом он уменьшал симптомы кишечной инфекции. Такая клиническая эффективность может быть обусловлена изменением факторов вирулентности кишечных бактериальных патогенов, не убивая их, как это наблюдается при субтерапевтическом уровне препарата. Субингибиторные концентрации рифаксимины- α изменяли вирулентность энтеротоксигенной *E.coli* и энтероагрегативной *E.coli*, а также *Shigella sonnei*. Экспрессия энтеротоксигенных факторов вирулентности *E.coli*, в том числе термостабильных и жаростойких энтеротоксинов и поверхностных адгезионных кишечносвязывающих факторов, снижалась при воздействии субингибиторных концентраций рифаксимины- α [45].

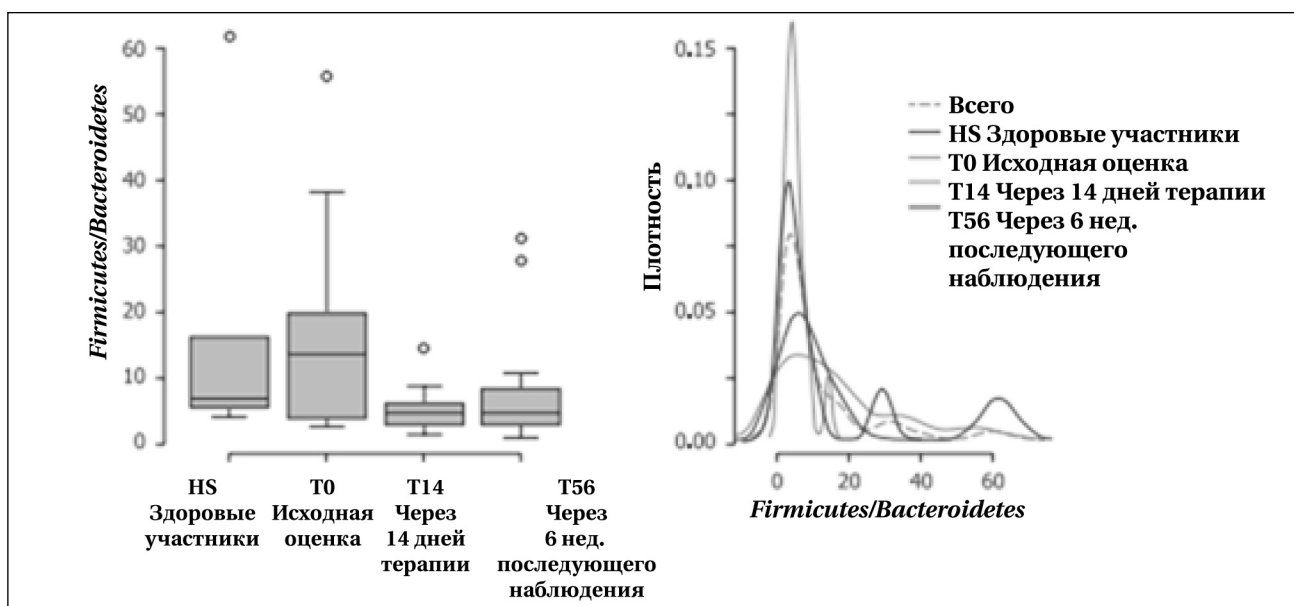


Рис. 3. Эубиотическое влияние рифаксими́на-α на микробиоту кишечника у пациентов с запором, связанным с синдромом раздражённого кишечника [33].

Кроме того, рифаксимин-α вызывает морфологические изменения как у восприимчивых, так и у резистентных штаммов бактерий в концентрациях до 1/32 от МИК. Рифаксимин-α подавляет процесс переноса плазмид у различных видов бактерий более чем на 99% и снижает жизнеспособность и вирулентность бактерий, даже несмотря на то, что у них развивается резистентность, что позволяет предположить, что воздействие Рифаксими́на-α в субингибиторной концентрации, может подавлять вирулентность патогена [46].

6. Уникальные свойства рифаксими́на-α обеспечивают его высокую эффективность в клинической практике

А. В лечении инфекционных диарей, в том числе диареи путешественников [18]:

- уменьшает продолжительность заболевания [47, 48];
- профилактирует его развитие даже при однодневном приеме А [18];
- обладает низким риском развития НЯ [47, 48].

Диарея путешественников определяется как учащённый до 3 и более раз/сут неоформленный стул или любое изменение поведения кишечника при перемене места постоянного жительства. Возбудителями могут быть любые известные кишечные патогены (бактерии в 80% случаев) в зависимости от их превалирования в отдельных географических регионах. Эффекты рифаксими́на-α при кишечных инфекциях — уменьшение

симптомов и длительности заболевания, эрадикация фекальных патогенов.

Н. Gomi и соавт. [49] *in vitro* тестировали антимикробную активность рифаксими́на-α в отношении кишечных патогенов, выделенных из образцов стула лиц с диареей путешественников, посетивших разные регионы мира (Индию, Мексику, Ямайку и Кению) — всего исследовано 284 вида (энтеротоксигенные и энтероагрегирующие кишечные патогены, семейства сальмонелл, шигелл, аэромонад, кампилобактера, нехолерных вибрионов).

Показан эффект рифаксими́на-α, который позволяет рассматривать препарат как действенное средство для профилактики и лечения диареи путешественников. В последующем был выполнен целый ряд клинических исследований, которые позволили подтвердить эффективность рифаксими́на-α [50–56].

Б. В профилактике развития всех осложнений цирроза печени [57]:

- снижает относительный риск развития спонтанного бактериального перитонита, кровотечения из варикозно-расширенных вен пищевода, гепаторенального синдрома и печёночной энцефалопатии (ПЭ) [57];
- значительно уменьшает развитие осложнений цирроза печени [58];
- повышает продолжительность жизни больных с циррозом печени [58].

Широкий антибактериальный спектр рифаксими́на-α способствует снижению патогенной кишечной бактериальной нагрузки, которая обуславливает некоторые патологические состояния. Рифаксимин-α снижает:

— образование бактериями аммиака и других токсических соединений, которые в случае тяжёлого заболевания печени, сопровождающегося нарушением процесса детоксификации, участвуют в патогенезе и симптоматике ПЭ;

— повышенную пролиферацию бактерий при синдроме избыточного роста микроорганизмов в кишечнике.

Рифаксимин- α связан с улучшением когнитивной функции и эндотоксемии у пациентов с минимальной ПЭ, что сопровождается изменением бактериальных связей с метаболитами в кишечнике (изменения метаболома) без значимого изменения численности микробов [59].

Эффективность рифаксими́на- α у пациентов с ПЭ подтверждена в ряде клинических плацебо-контролируемых исследований, а также в сравнительных исследованиях [60–63].

Данные открытого исследования показали, что непрерывная терапия рифаксими́ном- α обеспечивала продолжительную защиту от рецидивов ПЭ [64].

В. У пациентов с синдромом избыточного бактериального роста (СИБР) и синдромом раздраженного кишечника (СРК):

- Уменьшает симптомы СИБР [65].

- Нормализует показатели дыхательного водородного теста у пациентов с СИБР [65].

Под СИБР понимается патологическое состояние, в основе которого лежит повышенное заселение тонкой кишки, преимущественно фекальной микрофлорой, сопровождающееся хронической диареей и мальабсорбцией, в первую очередь жиров и витамина В₁₂.

В настоящий момент в клинической практике препаратом выбора для устранения избыточного бактериального роста в тонкой кишке является невсасывающийся кишечный антибиотик Альфа Нормикс® (рифаксимин- α).

В 2011 г. опубликованы результаты 2 сходных по структуре многоцентровых плацебо-контролируемых исследований III фазы (TARGET-1 и TARGET-2), в которых пациенты с СРК (623 и 637, соответственно; всего 1260) без запора (по Римским критериям II) принимали рифаксимин- α 550 мг или плацебо 3 раза в день в течение 2 нед. с последующим проспективным наблюдением в течение 10 нед. В обоих исследованиях продемонстрировано достоверное преимущество рифаксими́на- α по сравнению с плацебо в купировании общей симптоматики СРК в течение как минимум 2 нед. и в первые 4 нед. после окончания лечения («первичная конечная точка») (в исследовании TARGET-1 40,8% против 31,2%, соответственно, $p=0,01$; в исследовании TARGET-2 40,6 и 32,2%, соответственно, $p=0,03$). За этот же период показано уменьшение метеоризма при приёме рифаксими́на- α по сравнению с плацебо (в исследо-

вании TARGET-1 — 39,5% против 28,7%, $p=0,005$; в исследовании TARGET-2 — 41% против 31,9 %, $p=0,02$).

При дальнейшем наблюдении улучшение общих симптомов также оказалось сопоставимо в обоих исследованиях [66, 67].

В одной из обзорных работ отмечено, что применение рифаксими́на- α привело к купированию клинических проявлений СИБР у 33–92% пациентов и редукции СИБР у 84% больных с СРК [68]. Также наблюдается существенно лучшая переносимость рифаксими́на- α [69] и меньшая частота возникновения побочных эффектов [70] по сравнению с системными и другими внутрикишечными (невсасывающимися) антибиотиками.

Проводилось большое количество исследований для сравнения рифаксими́на- α с другими антибиотиками. В них была показана большая эффективность (63,4–70,0%) рифаксими́на- α по критерию нормализации водородного дыхательного теста [71], достоверное снижение пиковой и общей экскреции водорода [72–75].

- Способствует долговременному улучшению симптомов СРК [76].

Долгосрочные исследования СРК показали, что клинически значимые изменения чувствительности бактерий к другим классам антибиотиков, появление патогенных бактерий, возникновение условно-патогенных инфекций и изменение общей микробиоты отсутствовали [77].

Г. У пациентов с симптоматической неосложнённой дивертикулярной болезнью (СНДБ)

- уменьшает выраженность симптомов заболевания [78, 79];

- способствует профилактике развития дивертикулита [78, 79].

Дивертикулёз является распространённым (>60% после 70 лет) состоянием, а СНДБ является трудным в лечении заболеванием [80].

У пациентов с дивертикулярной болезнью наблюдается истощение членов микробиоты с противовоспалительными свойствами, включая IV кластер *Clostridium*, IX кластер *Clostridium*, *Fusobacterium* и *Lactobacillaceae* [81].

Изменения микробиоты коррелируют с иммунной активацией слизистой оболочки [82].

Было показано, что снижение избыточного бактериального роста с помощью рифаксими́на- α [80] снижает выработку Н₂ в толстой кишке и симптомы газообразования. Кроме того, антибиотикотерапия вызывает увеличение средней массы стула у пациентов, постоянно потребляющих клетчатку, скорее всего, из-за снижения распада клетчатки, что обусловлено сокращением популяций бактерий. Оба эффекта способствуют снижению внутрипросветного давления и приводят к облегчению боли [83].

Руководство GRIMAD (Итальянская группа по изучению дивертикулярной болезни) [84] и ру-

ководство SICCR (Итальянское общество хирургии толстой и прямой кишки) [85] указывают на преимущество рифаксими́на- α (в дополнение к растворимой или нерастворимой клетчатке) в облегчении симптомов у пациентов с СНДБ [86].

Д. В составе комплексного лечения хронических заболеваний кишечника [17]

- снижает степень активности болезни Крона при добавлении к основной терапии;
- способствует достижению ремиссии у некоторых пациентов с лёгким или среднетяжёлым обострением язвенного колита [87].

У пациентов с болезнью Крона рифаксимин- α , не изменяя общей структуры микробиоты толстой кишки человека, повышает количество бифидобактерий и приводит к изменению метаболического профиля, связанного с потенциальным благоприятным эффектом для носителя [88].

Е. Для профилактики послеоперационных осложнений у пациентов, у которых планируется проведение колоректальных хирургических вмешательств [17, 89], а кроме того:

- сокращает время послеоперационной госпитализации [89];
- способствует уменьшению болевого синдрома [90].

В хирургии толстой кишки проблема профилактики гнойно-септических осложнений является одной из наиболее актуальных. Исследования показывают, что применение антибиотиков позволяет уменьшить частоту гнойно-септических осложнений до 10–30% [91–94].

Пероральная и комбинированная антибиотикопрофилактика, включающая рифаксимин- α , встречается в литературе как один из рекомендуемых режимов при операциях на толстой кишке.

Использование препарата, активного в просвете кишки, снижает микробную обсеменённость кишки и, соответственно, контаминацию операционной раны, а также транслокацию эндогенной микрофлоры [95].

Результаты клинических исследований, полученные с рифаксимином- α , не могут быть распространены на другие кристаллические формы или аморфную форму рифаксими́на, поскольку в последнем случае системное поглощение может быть совершенно непредсказуемым. Патентная защита рифаксими́на- α (Альфа Нормикс®) сохраняется до 2024 г.

Выводы

Уникальная кристаллическая α форма препарата Альфа Нормикс®:

1. Обеспечивает минимальное всасывание в просвете ЖКТ:

- менее 1% рифаксими́на- α абсорбируется из ЖКТ при приёме внутрь [17];

— концентрация препарата в плазме после перорального приёма очень низкая (менее 10 нг/мл) не только у здоровых людей, но и у пациентов с повреждённой слизистой оболочкой кишечника [17, 18].

2. Создаёт высокую концентрацию действующего вещества в просвете кишечника:

- концентрация препарата в просвете кишечника значительно превосходит минимальную подавляющую концентрацию (МПК) для основных кишечных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [17, 18].

3. Характеризуется отсутствием бактериальной резистентности:

- высокая концентрация рифаксими́на- α в просвете кишечника является неблагоприятным условием для образования резистентных штаммов [24];

— резистентные штаммы исчезают из кишечника после прекращения терапии, так как являются нестабильными и не способны колонизировать ЖКТ [24].

4. Обладает дополнительными свойствами, которые усиливают его антибактериальное действие:

- предотвращает транслокацию бактерий из кишечника [25, 26];
- препятствует прикреплению бактерий к слизистой кишечника [25, 30];
- оказывает эубиотическое действие [32];
- снижает вирулентность бактерий [25];
- проявляет противовоспалительную активность [39].

5. Обеспечивает его высокую эффективность в клинической практике:

А. Рифаксимин- α эффективен в лечении инфекционных диарей, в том числе диареи путешественников [18]:

- уменьшает продолжительность заболевания [47, 48];
- профилактирует его развитие даже при однодневном приёме [18];
- обладает низким риском развития НЯ [47, 48].

Б. В профилактике развития всех осложнений цирроза печени [57]:

- снижает относительный риск развития спонтанного бактериального перитонита, кровотечения из варикозно-расширенных вен пищевода, гепаторенального синдрома и печёночной энцефалопатии [57];
- значительно уменьшает развитие осложнений цирроза печени [58];

— повышает продолжительность жизни больных с циррозом печени [58].

В. У пациентов с СИБР и СРК:

- уменьшает симптомы СИБР [65];

— нормализует показатели дыхательного водородного теста у пациентов с СИБР [65];

— способствует долговременному улучшению симптомов СРК [76].

Г. У пациентов с симптоматическим неосложнённым дивертикулёзом:

— уменьшает выраженность симптомов заболевания [78, 79];

— способствует профилактике развития дивертикулита [78, 79].

Д. В составе комплексного лечения хронических заболеваний кишечника [17]:

— снижает степень активности болезни Крона при добавлении к основной терапии;

— способствует достижению ремиссии у некоторых пациентов с легким или среднетяжелым обострением язвенного колита [47].

Е. Для профилактики послеоперационных осложнений у пациентов, у которых планируется проведение колоректальных хирургических вмешательств [17, 89], а кроме того:

— сокращает время послеоперационной госпитализации [89];

— способствует уменьшению болевого синдрома [90].

ЛИТЕРАТУРА

1. Huang L.F., Tong W.Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv Drug Delivery Rev* 2004; 56 (3): 321–334. doi: 10.1016/j.addr.2003.10.007.
2. Marchi E., Montecchi L. Imidazo-rifamycin derivatives with antimicrobial utility US Patent, 1982 No. 4,341,785.
3. Jiang Z.D., Ke S., Palazzini E., Riopel L., Dupont H. *In vitro* activity and fecal concentration of rifaximin after oral administration, *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2205–2206. doi: 10.1128/aac.44.8.2205-2206.2000.
4. Hoover W.W., Hugh Gerlach E., Hoban D.J. *et al.* Antimicrobial activity and spectrum of Rifaximin, a new topical Rifamycin derivative. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 16 (2): 111–118. doi: 10.1016/0732-8893(93)90004-q.
5. Jiang Z.D., DuPont H.L. Rifaximin: *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity. A review, *Chemotherapy* 2005; 51 (Suppl 1): 67–72. doi: 10.1159/000081991.
6. Ericsson C.D., DuPont H.L. Rifaximin in the treatment of infectious diarrhea, *Chemotherapy* 2005; 51 (Suppl 1): 73–80. doi: 10.1159/000081992.
7. Baker D.E. Rifaximin: a nonabsorbed oral antibiotic. *Rev Gastroenterol Disord* 2005; 5 (1): 19–30.
8. Lamanna A., Orsi A. *In vitro* activity of rifaximin and rifampicin against some anaerobic bacteria, *Chimioterapia* 1984; 3 (6): 365–367.
9. Descombe J.J., Dubourg D., Picard M., Palazzini E. Pharmacokinetic study of rifaximin after oral administration in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Res* 1994; 14 (2): 51–56.
10. Taylor D.N., Bourgeois A.L., Ericsson C.D. *et al.* A randomized, double-blind, multicenter study of rifaximin compared with placebo and with ciprofloxacin in the treatment of travelers' diarrhea. *Amer J Trop Med* 2006; 74: 1060–1066.
11. Grant D.J.W. Theory and origin of polymorphism. In: Brittain HG, editor. *Polymorphism in pharmaceutical solids*. New York: Marcel Dekker; 1999: 1–34.
12. Rodriguez-Spong B., Price C.P., Jayasankar A., Matzger A.J., Rodriguez-Hornedo N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 241–274.
13. Viscomi G.C., Campana M., Barbanti M., Grepioni F., Polito M., Confortini D. *et al.* Crystal forms of rifaximin and their effect on pharmaceutical properties. *Cryst Eng Comm* 2008; 10: 1074–1081.
14. Scarpignato C., Barbara G., Lanis L. *et al.* Management of colonic diverticular disease in the third millennium: Highlights from a symposium held during the United European Gastroenterology Week 2017. *Ther Adv Gastroenterol* 2018; 11: 1–21. doi: 10.1177/1756284818771305.
15. Noeske J., Nkamsse P.N. Impact of resistance to antituberculosis drugs on treatment outcome using World Health Organization standard regimens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 (4): 429–433.
16. Senol G., Komurcuoglu B., Komurcuoglu A. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Turkey: a retrospective study from 1100-bed teaching hospital. *J Infect* 2005; 50 (4): 306–311.
17. Инструкция по медицинскому применению препарата АЛЬФА НОРМИКС®. Дата обращения: 14.04.2020. / Instruksiya po meditsinskomu primeneniyu preparata AL'FA NORMIKS®. Data obrashcheniya: 14.04.2020. [in Russian]
18. Экспериментальная и клиническая фармакология селективного кишечного антибиотика рифаксимина. *Педиатрическая фармакология*. — 2008. — № 5 (3). — С. 120–128. / Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya selektivnogo kishchnogo antibiotika rifaksimina. *Pediatricheskaya Farmakologiya* 2008; 5 (3): 120–128. [in Russian]
19. Blandizzi C. *et al.* Is generic rifaximin still a poorly absorbed antibiotic? A comparison of branded and generic formulations in healthy volunteers. *Pharmacol Res* 2014; http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.05.001.
20. Soro O., Pesce A., Raggi M., Debbia F.A., Schito G.C. Selection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* does not occur in the presence of low concentration of rifaximin. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 147–151.
21. Novoa-Farias O., Frati-Munari A.C., Peredo M.A., Flores-Juarez S., Novoa-Garcia O., Galicia-Tapia J. *et al.* Susceptibility to rifaximin and other antimicrobial agents of bacteria isolated from acute gastrointestinal infections in Mexico. *Rev Gastroenterol Mex* 2016; 81: 3–10.
22. Gatta L., Scarpignato C. Systematic review with metaanalysis: rifaximin is effective and safe for the treatment of small intestine bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; 45: 604–616.
23. Latella G., Pimpo M.T., Sottili S., Zippi M., Viscido A., Chiara-monte M. *et al.* Rifaximin improves symptoms of acquired uncomplicated diverticular disease of the colon. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 55–62.
24. Brigidi P., Swennen E., Rizzello F., Bozzolascio M., Matteuzzi D. Effects of rifaximin administration on the intestinal microbiota in patients with ulcerative colitis. *J Chemother* 2002 Jun; 14 (3): 290–295. doi: 10.1179/joc.2002.14.3.290.
25. Calanni F., Renzulli C., Barbanti M., Viscomi G.C. Rifaximin: beyond the traditional antibiotic activity. *J Antibiot (Tokyo)* 2014 Sep; 67 (9): 667–670. doi: 10.1038/ja.2014.106.
26. Fiorucci S., Distrutti E., Mencarelli A. *et al.* Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifaximin modulates lamina propria monocyte cells reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. *Digestion* 2002; 66 (4): 246–256. doi: 10.1159/000068362.
27. Bajaj J.S., Hylemon P.B., Ridlon J.M. *et al.* Colonic mucosal microbiome differs from stool microbiome in cirrhosis and hepatic encephalopathy and is linked to cognition and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303 (6): 675–685.
28. Bellot P., Francés R., Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int* 2013; 33 (1): 31–39.
29. Miele L., Valenza V., La Torre G. *et al.* Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49 (6): 1877–1887.
30. Brown J.A. *et al.* Pre-steady state kinetic analysis of the incorporation of anti-HIV nucleotide analogs catalyzed by human X- and Y-family DNA polymerases. *Antimicrob Agents Chemother* Nov 2010. DOI: 10.1128/AAC.01229-10.
31. Brown E.L., Xue Q., Jiang Z.D., Xu Y., Dupont H.L. Pretreatment of epithelial cells with rifaximin alters bacterial attachment and internalization profiles. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (1): 388–396. doi:10.1128/AAC.00691-09
32. Ponziani F.R., Scaldaferrì F., Petito V. The Role of Antibiotics in Gut Microbiota Modulation: The Eubiotic Effects of Rifaximin. *Dig Dis* 2016; 34 (3): 269–278. doi: 10.1159/000443361.
33. Soldi S., Vasileiadis S., Uggeri F. *et al.* Modulation of the gut microbiota composition by rifaximin in non-constipated irritable bowel syndrome patients: a molecular approach. *Clin Exp Gastroenterol* 2015; 8: 309–325.
34. Maccaferri S., Vitali B., Klinder A. *et al.* Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an *in vitro* approach using a continuous culture colonic model system. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65 (12): 2556–2565. doi:10.1093/jac/dkq345
35. Bajaj J. S. *et al.* Modulation of the metabiome by rifaximin in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *PLoS ONE* 2013; 8: e60042. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060042
36. Kalambokis G. N. *et al.* Rifaximin improves systemic hemodynamics and renal function in patients with alcohol-related cirrhosis and ascites. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 815–818.
37. Kakiyama G. *et al.* Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol* 2013; 58 (5): 949–955. doi:10.1016/j.jhep.2013.01.003

38. Xu D. *et al.* Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology* 2014; 146 (2): 484–496.e4. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.026
39. Cianci R. *et al.* *Scand J Gastroenterol.* 2009; 44: 108–115.
40. Cuomo R., Barbara G., Annibale B. Rifaximin and diverticular disease: position paper of the Italian Society of Gastroenterology (SIGE). *Dig Liver Dis* 2017; 49: 595–603.
41. Cheng J., Shah Y. M., Gonzalez F. J. Pregnane X receptor as a target for treatment of inflammatory bowel disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33 (6): 323–330. doi:10.1016/j.tips.2012.03.003
42. Mencarelli A. *et al.* Inhibition of NF-kappaB by a PXR-dependent pathway mediates counter-regulatory activities of rifaximin on innate immunity in intestinal epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2011; 668 (1–2): 317–324. doi:10.1016/j.ejphar.2011.06.058.
43. Cheng J. *et al.* Therapeutic role of rifaximin in inflammatory bowel disease: clinical implication of human pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 335 (1): 32–41. doi:10.1124/jpet.110.170225
44. Terc J., Hansen A., Alston L., Hirota S. A. Pregnane X receptor agonists enhance intestinal epithelial wound healing and repair of the intestinal barrier following the induction of experimental colitis. *Eur J Pharm Sci* 2014; 55: 12–19. doi:10.1016/j.ejps.2014.01.007
45. Jiang Z. D., Ke S., DuPont H. L. Rifaximin-induced alteration of virulence of diarrhea-producing *Escherichia coli* and *Shigella sonnei*. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35 (3): 278–281. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.11.013.
46. Debbia E.A., Maioli E., Roveta S., Marchese A. Effects of rifaximin on bacterial virulence mechanisms at supra- and sub-inhibitory concentrations. *J Chemother* 2008; 20 (2): 186–194. doi:10.1179/joc.2008.20.2.186.
47. Shayto R.H., Mrad R.A., Sharara A.I. Use of rifaximin in gastrointestinal and liver diseases. *World J Gastroenterol* 2016 Aug 7; 22 (29): 6638–6651. doi: 10.3748/wjg.v22.i29.6638.
48. Kyoung Sup Hong. Rifaximin for the treatment of acute infectious diarrhea. *Therap Adv Gastroenterol* 2011 Jul; 4 (4): 227–235. doi: 10.1177/1756283X11398734.
49. Gomi H., Jiang Z.-D., Adacchi J.A. *et al.* *In vitro* antimicrobial susceptibility testing of bacterial enteropathogens causing traveler's diarrhea in four geographic regions. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 45: 212–216.
50. DuPont H.L., Jiang Z.D., Belkind-Garson J. *et al.* Treatment of travelers' diarrhea: randomized trial comparing rifaximin, rifaximin plus loperamide, and loperamide alone. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 451–456.
51. DuPont H.L., Jiang Z.D., Ericsson C.D. *et al.* Rifaximin versus ciprofloxacin for the treatment of traveler's diarrhea: a randomized, double-blind clinical trial. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1807–1815.
52. DuPont H.L., Haake R., Taylor D.N. *et al.* Rifaximine treatment of pathogen-negative travelers' diarrhea. *J Travel Med* 2007; 14: 16–19.
53. Taylor D.N., Bourgeois A.L., Ericsson C.D. *et al.* A randomized, double-blind, multicenter study of rifaximin compared with placebo and with ciprofloxacin in the treatment of travelers' diarrhea. *Am J Trop Med* 2006; 74: 1060–1066.
54. Steffen R., Sack D.A., Riopel L. *et al.* Therapy of travelers' diarrhea with rifaximin on various continents. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1073–1078.
55. Zanger P., Nurjadi D., Gabor J. *et al.* Effectiveness of rifaximin in prevention of diarrhea in individuals travelling to south and southeast Asia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 946–954.
56. Hu Y., Ren J., Zhan M. *et al.* Efficacy of rifaximin in prevention of travelers' diarrhea: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Travel Med* 2012; 19: 352–356.
57. Flamm S.L., Mullen K.D., Heimanson Z., Sanyal A.J. Rifaximin has the potential to prevent complications of cirrhosis. *Therap Adv Gastroenterol* 2018; 11: 1756284818800307. doi: 10.1177/1756284818800307.
58. Kang S.H. *et al.* *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2017; 46: 9: 845–855.
59. Bajaj J.S., Heuman D.M., Sanyal A.J. *et al.* Modulation of the microbiome by rifaximin in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *PLoS One* 2013; 8: e60042.
60. Di Piazza S., Gabriella F.M., Valenza L.M. *et al.* Rifaximine versus neomycin in the treatment of portosystemic encephalopathy. *Ital J Gastroenterol* 1991; 23: 403–407.
61. Pedretti G., Calzetti C., Missale G., Fiaccadori F. Rifaximin versus neomycin on hyperammonemia in chronic portal systemic encephalopathy of cirrhotics: a double-blind, randomized trial. *Ital J Gastroenterol* 1991; 23: 175–178.
62. Bucci L., Palmieri G.C. Double-blind, double-dummy comparison between treatment with rifaximin and lactulose in patients with medium to severe degree hepatic encephalopathy. *Curr Med Res Opin* 1993; 13: 109–118.
63. Mas A., Rodes J., Sunyer L. *et al.* Comparison of rifaximin and lactitol in the treatment of acute hepatic encephalopathy: results of a randomized, double-blind, double-dummy, controlled clinical trial. *J Hepatol* 2003; 38: 51–58.
64. Mullen K.D., Sanyal A., Bass N.M., Poordad F., Sheikh M.Y., Frederick R.T. *et al.* Long-term Safety and Efficacy of Rifaximin for the Maintenance of Remission from Overt Hepatic Encephalopathy in Patients with Cirrhosis (submitted). Submitted. 2013.
65. Shayto R.H., Mrad R.A., Sharara A.I. Use of rifaximin in gastrointestinal and liver diseases. *World J Gastroenterol* 2016 Aug 7; 22 (29): 6638–6651. doi: 10.3748/wjg.v22.i29.6638.
66. Pimentel M., Lembo A., Chey W.D. *et al.* Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *New Engl J Med* 2011; 364: 22–32.
67. Маев И.В., Черемушкин С.В., Кучерявый Ю.А., Черемушкина Н.В. Фармакотерапия синдрома раздраженного кишечника с позиций доказательной медицины. *Терапевтический архив*. — 2015. — № 2. — С. 4–10. doi: 10.17116/terarkh20158724-10. / Маев И.В., Черемушкин С.В., Кучерявый Ю.А., Черемушкина Н.В. Фармакотерапия синдрома раздраженного кишечника с позиций доказательной медицины. *Терапевтический архив* 2015; 2: 4–10. doi: 10.17116/terarkh20158724-10. [in Russian]
68. Drossman D.A., Corazziari E., Delvaux M., Spiller R., Talley N.J., Thompson W.G. *et al.* Rome III: The Functional Gastrointestinal Disorders. 3rd ed. McLean, VA: Degnon Associates, 2006; 30.
69. Dupont H.L., Jiang Z.D., Ericsson C.D. Rifaximin versus ciprofloxacin for the treatment of traveler's diarrhea: a randomized, double-blind clinical trial. *Clin Infect Dis* 2001; 33 (11): 1807–1815.
70. Lakshmi C.P., Ghoshal U.C., Kumar S., Goel A., Misra A., Mohindra S. *et al.* Frequency and factors associated with small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis of the liver and extra hepatic portal venous obstruction. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1142–1148.
71. Lauritano E.C., Gabrielli M., Scarpellini E. Antibiotic therapy in small intestinal bacterial overgrowth: rifaximin versus metronidazole. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2009; 13 (2): 111–116.
72. Агафонова Н.А. Невсасывающиеся (кишечные) антибактериальные препараты в гастроэнтерологии: спектр применения рифаксимина. *Consilium medicum. Гастроэнтерология*. — 2009. — № 1. — С. 61–66. / Agafonova N.A. Nevsasyvayushchiesya (kishechnye) antibakterial'nye preparaty v gastroenterologii: spektr primeneniya rifiksmina. *Consilium medicum. Gastroenterologiya* 2009; 1: 61–66. [in Russian]
73. Gasbarrini A., Lauritano E.C., Gabrielli M. Small intestinal bacterial overgrowth: diagnosis and treatment. *Dig Dis* 2007; 25 (3): 237–240.
74. Peralta S., Cottone C., Doveri T. *et al.* Small intestine bacterial overgrowth and irritable bowel syndrome-related symptoms: experience with Rifaximin. *World J Gastroenterol* 2009; 5 (21): 2628–2631.
75. Scarpellini E., Gabrielli M., Lauritano C.E. High dosage rifaximin for the treatment of small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25 (7): 781–786.
76. Saadi M., McCallum R.W. Rifaximin in irritable bowel syndrome: rationale, evidence and clinical use. *Ther Adv Chronic Dis* 2013; 4 (2): 71–75. doi: 10.1177/2040622312472008.
77. Pimentel M., Cash B.D., Lembo A. *et al.* Repeat rifaximin for irritable bowel syndrome: no clinically significant changes in stool microbial antibiotic sensitivity. *Dig Dis Sci* 2017; 62: 2455–2463.
78. Shayto R.H., Mrad R.A., Sharara A.I. Use of rifaximin in gastrointestinal and liver diseases. *World J Gastroenterol* 2016 Aug 7; 22 (29): 6638–6651. doi: 10.3748/wjg.v22.i29.6638.
79. Лечение дивертикулярной болезни кишечника в третьем тысячелетии: Основные тезисы симпозиума, состоявшегося в рамках Объединенной европейской гастроэнтерологической недели 2017. / Lechenie divertikulyarnoy bolezni kishchnika v tret'em tysyacheletii: Osnovnye tezisy simpoziuma, sostoyavshegosya v ramkakh Ob'edinennoy evropejskoj gastroenterologicheskoy nedeli 2017. [in Russian]
80. Gatta L., Scarpignato C. Systematic review with meta-analysis: rifaximin is effective and safe for the treatment of small intestine bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; 45: 604–616.
81. Barbara G., Scaiola E., Barbaro M.R. *et al.* Gut microbiota, metabolome and immune signatures in patients with uncomplicated diverticular disease. *Gut* 2017; 66: 1252–1261.
82. Annibale B., Lahner E., Maconi G. *et al.* Clinical features of symptomatic uncomplicated diverticular disease: a multicenter Italian survey. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27: 1151–1159.
83. Frieri G., Pimpo M.T., Scarpignato C. Management of colonic diverticular disease. *Digestion* 2006; 73 (Suppl. 1): 58–66.
84. Cuomo R., Barbara G., Pace F. *et al.* Italian consensus conference for colonic diverticulosis and diverticular disease. *United European Gastroenterol J* 2014; 2: 413–442.
85. Binda G.A., Cuomo R., Laghi A. *et al.* Practice parameters for the treatment of colonic diverticular disease: Italian Society of Colon and Rectal Surgery (SICCR) guidelines. *Tech Coloproctol* 2015; 19: 615–626.
86. Scarpignato C. *Ther Adv Gastroenterol* 2018; 11: 1–21 doi: 10.1177/1756284818771305.
87. Shayto R.H., Mrad R.A., Sharara A.I. Use of rifaximin in gastrointestinal and liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2016 Aug 7; 22 (29): 6638–6651. doi: 10.3748/wjg.v22.i29.6638.

88. *Maccaferri S., Vitali B., Klinder A. et al.* Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2556–2565.
89. *Scarpignato C.* Rifaximin, a Poorly Absorbed Antibiotic: Pharmacology and Clinical Use. Karger Medical and Scientific Publishers. 2005; 51.
90. *Moroz N., Sitarz R., Mruk A. et al.* The use of rifaximin in pre-operative period of patients with tumors of the gastrointestinal tract — a retrospective study (2013–2016). *Pol Przegl Chir* 2018; 28; 90 (1): 35–40. doi: 10.5604/01.3001.0011.5958.
91. *Беденков А.В., Базаров А.С., Страчунский Л.С. и др.* Рутинная практика периоперационного назначения антибиотиков при абдоминальных операциях в России: результаты многоцентрового исследования. Клиническая микробиология и антимикробная терапия. — 2003. — Т. 5. — № 12. — С. 234–241. / *Bedenkov A.V., Bazarov A.S., Strachunskij L.S. i dr.* Rutinnaya praktika perioperatsionnogo naznacheniya antibiotikov pri abdominal'nykh operatsiyakh v Rossii: rezul'taty mnogotsentrovogo issledovaniya. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Terapiya* 2003; 5: 12: 234–241. [in Russian]
92. *Голуб А.В., Козлов Р.С.* Антибиотикопрофилактика в колоректальной хирургии. Клиническая микробиология и антимикробная терапия. — 2007. — Т. 9. — № 3. — С. 244–252. / *Golub A.V., Kozlov R.S.* Antibiotikoprofilaktika v kolorektal'noj khirurgii. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Terapiya* 2007; 9: 3: 244–252. [in Russian]
93. *Плешков В.Г., Голуб А.В., Беденков А.В. и др.* Рутинная практика периоперационного назначения антибиотиков в хирургических стационарах Смоленской области. Инфекции в хирургии. — 2004. — Т. 2. — № 18. — С. 24. / *Pleshkov V.G., Golub A.V., Bedenkov A.V. i dr.* Rutinnaya praktika perioperatsionnogo naznacheniya antibiotikov v khirurgicheskikh statsionarakh Smolenskoj oblasti. *Infektsii v Khirurgii* 2004; 2: 18: 24. [in Russian]
94. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten — Merkblätter für Ärzte: *Clostridium difficile*. *Epid Bull* 2009; 24: 234–239.
95. *Забихова А.Г., Абелевич А.И.* Профилактика послеоперационных гнойно-септических осложнений и *C.difficile*-ассоциированного колита в колоректальной хирургии. Медицинский альманах. — 2013. — № 5 (29). — С. 126–129. / *Zabikhova A.G., Abelevich A.I.* Profilaktika posleoperatsionnykh gnojno-septicheskikh oslozhnenij i *C. difficile*-assotsiirovannogo kolita v kolorektal'noj khirurgii. *Meditsinskij Al'manakh* 2013; 5 (29): 126–129. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Зырянов Сергей Кенсаринович — д. м. н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Российский Университет Дружбы Народов», Москва

Байбулатова Елена Александровна — к. м. н., ассистент кафедры общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Российский Университет Дружбы Народов», Москва

Реактивные артриты: современные аспекты диагностики и лечения

*Б. С. БЕЛОВ, Р. М. БАЛАБАНОВА

ФБГНУ НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой

Reactive Arthritis: Modern Aspects of Diagnosis and Treatment

*B. S. BELOV, R. M. BALABANOVA

V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow

В настоящее время проблема реактивных артритов (РеА) сохраняет свою значимость. Это обусловлено достаточной высокой распространённостью заболевания, в первую очередь, в России. Анализ эпидемиологических данных позволяет выдвинуть ряд возможных причин, объясняющих различную частоту РеА в отдельных регионах РФ и в других странах. В лекции подробно освещена клиническая картина болезни, проанализирована значимость различных лабораторных методов, направленных на выявление возбудителя РеА. Представлены Российские диагностические критерии РеА. Излагаются основные подходы к терапии РеА с акцентом на применение антимикробных препаратов. Эффективность и безопасность медикаментозной иммунокоррекции (индукторы интерферона, полиоксидоний, иммунофан и т. д.) в лечении урогенитального хламидиоза у больных РеА не подтверждены данными рандомизированных контролируемых исследований.

Ключевые слова: реактивный артрит, урогенитальный хламидиоз, диагностика, антимикробная терапия.

Currently, the problem of reactive arthritis (ReA) retains its importance due to the fairly high prevalence of the disease, primarily in Russia. Analysis of epidemiological data allows us to put forward a number of possible reasons explaining the different frequency of ReA in certain regions of the Russian Federation and in other countries. The lecture describes the clinical picture of the disease, as well as analyzes the significance of various laboratory techniques aimed at identifying the causative agent of ReA. The Russian diagnostic criteria for ReA are presented. The main approaches to the therapy of ReA are outlined with an emphasis on the use of antimicrobial drugs. The effectiveness and safety of drug immunocorrection (inducers of interferon, polyoxidonium, immunofan, etc.) in the treatment of urogenital chlamydia in patients with ReA have not been confirmed by data from randomized controlled trials.

Keywords: reactive arthritis, urogenital chlamydia, diagnostics, antimicrobial therapy.

Реактивные артриты (РеА) представляют собой воспалительные негнойные заболевания суставов, которые развиваются в тесной хронологической связи (обычно не позднее, чем через 1 мес.) с перенесённой кишечной или урогенитальной инфекцией. Они относятся к группе серонегативных спондилоартритов и, как правило, ассоциируются с наличием HLA-B27-антигена. РеА необходимо отличать от постинфекционных артритов, которые могут развиваться в рамках реакции макроорганизма на любой инфекционный агент.

В 1818 г. В. Brody впервые описал классическую триаду болезни (артрит, уретрит, конъюнктивит). После выделения Нейссером возбудителя гонореи в 1879 г. была очерчена отдельная группа больных с артритом в рамках диссеминированной гонококковой инфекции. В 1916 г. французскими врачами Фиссенже и Леруа описано 4 случая так называемого уретрокулоосиновидального

синдрома. В это же время Г. Рейтер сообщает о развитии данного синдрома у немецкого солдата и предполагает спирохету в качестве триггерного (пускового) агента. Получивший впоследствии широкое распространение эпоним «синдром Рейтера» стали применять для обозначения варианта артрита в сочетании с конъюнктивитом и уретритом, а также с другими симптомами, указанными ниже. Поражение позвоночника при синдроме Рейтера впервые описано в 1953 г. [1]. Позднее (1960 г.) было показано, что более 20% больных с этой патологией имеют сакроилиит [2]. Термин «реактивный артрит» предложили в 1969 г. финские авторы, которые описали РеА, индуцированный йерсиниозной инфекцией, охарактеризовали клинические (в т. ч. внесуставные) симптомы и верифицировали возбудителя серологическими методами [3].

В начале 2000-х гг. был опубликован ряд материалов, в которых рассказывалось о сотрудничестве Рейтера с германскими нацистами во время Второй мировой войны и его участии в экспериментах над заключёнными концлагерей, что при-

© Б. С. Белов, Р. М. Балабанова, 2020

*Адрес для корреспонденции: Каширское ш., 34А, ФБГНУ НИИР им. В. А. Насоновой, г. Москва, 115522

вело к гибели тысяч людей. В связи с этим, экспертами ряда научных медицинских обществ, включая Американскую ассоциацию спондилита, а также адвокатскими группами, представляющими интересы этих больных, было выдвинуто настоятельное требование об исключении из обращения термина «синдром Рейтера» и замене его на «реактивный артрит». В октябре 2003 г. на собрании редакторов ревматологических журналов было принято решение об указанной замене [4].

Эпидемиология

Распространённость РеА, по данным большинства авторов, составляет 4,6–13 и 5–14 случаев на 100 000 населения для урогенной и энтеро-генной формы, соответственно. Однако цифры, по всей вероятности, занижены. Так, в исследовании, выполненном в Южной Швеции, ежегодная частота РеА составила 28 на 100 тыс. В Германии 30% больных с асимптомной хламидийной инфекцией страдают РеА. При недифференцированном спондилоартрите (СА) в 42% случаев выявляется *Chlamydia trachomatis*. По данным ретроспективного анализа, выполненного в НИИ ревматологии, у стационарных пациентов с достоверным СА в 33% случаев имела место хламидийная инфекция (преимущественно у лиц мужского пола в возрасте 17–20 лет), в то время как кишечная инфекция отмечена лишь у 5% больных.

По данным Минздрава России (форма №12), распространённость РеА среди взрослого населения в последние годы составляет 35–43 на 100 тыс. населения, причём имеются значительные различия по федеральным округам. Различная частота РеА как в отдельных регионах РФ, так и в других странах может быть объяснена рядом возможных причин:

- разнообразие генетического фона в обследованных популяциях, в т. ч. различная частота HLA-B27;
- вариабельность частоты инфекций, вызываемых одним и тем же возбудителем — потенциальным триггером РеА, в конкретном регионе в разные периоды времени;
- снижение распространённости возбудителей РеА по причине своевременной диагностики, адекватной терапии триггерных инфекций, а также проведения профилактических мероприятий;
- отсутствие проведения своевременной микробиологической диагностики вследствие спонтанного купирования симптоматики РеА (70–80%);
- асимптомное течение урогенитальной инфекции, «запускающей» патогенез РеА;
- гипо- или гипердиагностика РеА из-за наличия перекрестных симптомов, встречающихся при других СА.

Поражаются преимущественно молодые люди в возрасте 20–40 лет. Для энтеро-генного РеА

характерно одинаковое распределение между полами, в то время как урогенная форма наблюдается преимущественно у мужчин.

Этиология

Этиологические агенты, вызывающие РеА, относятся к возбудителям преимущественно кишечных или урогенитальных инфекций (табл. 1). Для них характерны: тропность к слизистым оболочкам, высокая контагиозность, наличие обладающих перекрёстной реактивностью липополисахаридов в наружной мембране, а также ещё полностью не идентифицированных специфических факторов вирулентности, способствующих выживанию и диссеминации возбудителя в организме.

В качестве наиболее значимого этиологического агента урогенного РеА (УРеА) рассматривается *Chlamydia trachomatis* — облигатный внутриклеточный микроб с жизненным циклом, характеризующимся последовательной сменой двух высокоспецифичных форм с адаптацией к существованию внутри и вне клетки. Элементарные тельца (ЭТ) прикрепляются к чувствительным клеткам, поглощаются ими с формированием внутриклеточной вакуоли и реорганизуются в метаболически неактивные внутриклеточные образования — ретикулярные тельца (РТ). В дальнейшем происходит бинарное деление РТ внутри образовавшейся эндосомы, вторичная реорганизация РТ в ЭТ и высвобождение инфекционных ЭТ в результате цитолиза или экзоцитоза, что ведёт к заражению новых клеток. Полный цикл развития хламидий при изучении *in vitro* на культуре чувствительных клеток длится 48–72 ч в зависимости от штамма, природы клеток-хозяев и условий среды. Течение хламидийной инфек-

Таблица 1. Возбудители инфекций — триггеры РеА [5, 6]

Кишечные инфекции	
<i>Salmonella</i> (различные серотипы)	
<i>Shigella</i>	
	<i>S.flexneri</i>
	<i>S.dysenteriae</i>
	<i>S.sonnei</i>
<i>Yersinia</i>	
	<i>Y.enterocolitica</i> (серотипы 0:3 и 0:9)
	<i>Y.pseudotuberculosis</i>
<i>Campylobacter</i>	
	<i>C.jejuni</i>
	<i>C.coli</i>
<i>Clostridium difficile</i>	
<i>Escherichia coli</i> (штаммы, вызывающие диарею)	
Урогенитальные инфекции*	
	<i>Chlamydia trachomatis</i>
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
Респираторные инфекции	
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>

Примечание. * — роль *M.genitalium* в развитии РеА до сих пор не определена.

ции, как в целом, так и при РеА во многом определяется способностью возбудителей к образованию аберрантных (персистентных) форм, отличающихся рядом свойств от обычных (продуктивных) (табл. 2). С наличием этих форм связан ряд проблем, возникающих при обследовании и лечении больных РеА (см. ниже).

Патогенез

Посредством фагоцитоза макрофагами и дендритными клетками возбудитель попадает из очага первичной инфекции в суставы и другие отделы макроорганизма. В синовиальной оболочке и синовиальной жидкости обнаруживают живые микробы, способные к делению. Большое значение придаётся феномену молекулярной мимикрии. Суть его состоит в том, что у возбудителя и «хозяина» имеются общие антигенные детерминанты. При этом иммунный ответ, инициируемый компонентами клеточной стенки возбудителей РеА (т. н. «артритогенными пептидами»), может повлечь за собой развитие перекрестных реакций со схожими аутоантигенами поражаемых тканей человека. Персистенция антигенов триггерных микробов в макроорганизме может быть причиной длительно сохраняющегося высокого уровня антител к возбудителю.

В последние годы активно обсуждаются разнообразные иные аспекты патогенеза РеА: роль клеточных toll-like-рецепторов, активируемых лигандами хламидий, гипотеза дисбаланса цитокинов, неэффективность иммунного ответа, заключающаяся в недостаточной элиминации возбудителей и их антигенов из суставной полости и т. д.

Морфологические изменения в синовиальной мембране напоминают таковые при инфекционном артрите и проявляются отёком, гиперемией и инфильтрацией синовиальной нейтрофильными лейкоцитами. При хроническом течении формируется неспецифический синовит с умеренным скоплением лимфоидных и плазматических клеток.

Клиническая картина

Клиническая картина РеА протекает однотипно независимо от этиологических факторов. Симптомы триггерной инфекции, большей частью кишечной, стихают или полностью регрессируют к моменту развития заболевания.

Болезнь развивается через 3–60 дней после перенесённой инфекции и начинается, как правило, остро с появления лихорадочного синдрома (50% случаев) и развития асимметричного олигоартрита с преимущественным поражением суставов нижних конечностей: коленных, голеностопных, пальцев стоп (особенно, первых). Быстрое развитие выпота в коленном суставе может привести к образованию подколенных кист с последующим их разрывом и формированием псевдо-

Таблица 2. Основные характеристики *Chlamydia trachomatis*-инфекции [7]

Признаки	<i>C. trachomatis</i> -инфекция	
	продуктивная	персистентная
Морфология	ЭТ/РТ	аберрантные формы
Культура	+	—
Метаболическая активность	+	+
Экспрессия генов		
— МOMP	+	—
— HSP	+	+++
— ЛПС	+	—
— белков цитокинеза	+	—
— репликации ДНК	+	+
Получение энергии		
— гликолиз	+	—
— АТФ/АДФ	+	+

флебитического синдрома. Суставы верхних конечностей поражаются значительно реже.

В 10–16% случаев, преимущественно при УРеА, развивается тендовагинит отдельных пальцев стоп, проявляющийся выраженной болью, отёчностью и специфической багрово-синюшной кожной окраской («палец-сосиска»). У 30% больных наблюдается поражение энтезисов (мест прикрепления сухожилий и связок к костям возле суставов), с наиболее частой локализацией в пяточных областях. Характерно наличие ахиллобурситов, подошвенных апоневрозитов и трохантеритов.

На ранней стадии болезни примерно в половине случаев выявляют признаки поражения позвоночника — боли в нижнем отделе и/или в области проекции крестцово-подвздошных сочленений, чувство скованности, спазм паравerteбральных мышц; боль, как правило, имеет воспалительный ритм.

Среди внесуставных проявлений РеА наиболее типичным является поражение глаз. В 30% случаев наблюдается двусторонний катаральный слабовыраженный конъюнктивит, который обычно появляется вместе с артритом и угасает в течение нескольких дней даже без лечения. Примерно у 5% больных отмечается острый передний увеит, который может привести к прогрессирующему снижению зрения вплоть до полной слепоты. При рецидивирующем течении болезни описаны кератит, язва роговицы, эписклерит, ретробульбарный неврит.

Весьма специфичными для РеА являются поражения кожи и слизистых оболочек, в частности кератодермия ладоней и подошв (5–20% случаев), которую ранее ошибочно относили к гонорейной инфекции и обозначали как «keratoderma blennorrhagica». Эти изменения клинически и морфологически напоминают пустулёзный псориаз. Кроме этого, возможно наличие кератодермических псориазоподобных высыпаний на различных участках тела и волосистой части головы. У 6–12% больных наблюдаются поражения ногтей (чаще — на пальцах стоп) по типу ониходис-

трофии (изменение цвета, повышенная ломкость, шероховатость, бугристость ногтей), подногтевого гиперкератоза, онихолизиса. В отличие от истинного псориаза упомянутые изменения исчезают при выздоровлении или ремиссии РеА.

Достаточно часто (20–40%) встречается кольцевидный баланит или баланопостит. В 5–10% случаев наблюдаются малосимптомные безболезненные эрозии в полости рта, которые могут оставаться незамеченными. Возможно развитие узловой эритемы (15%), чаще у больных с йерсиниозным РеА.

Необходимо отметить, что симптомы со стороны урогенитального тракта (уретрит, простатит, цервицит, сальпингоофорит) и желудочно-кишечного тракта (колит) могут быть как отражением триггерной инфекции, так и системными проявлениями РеА. В частности, у больных УРеА при проведении колоноскопии патология кишечника выявляется в 25% случаев.

Одним из проявлений УРеА может быть лимфаденопатия, особенно паховая, которая отражает реакцию регионарных лимфоузлов на тазовый очаг инфекции. Возможно поражение скелетных мышц по типу миозита, невриты периферических нервов. Имеются сообщения о развитии аортита с формированием недостаточности аортального клапана и миокардита с нарушениями атриовентрикулярной проводимости. При хронических формах течения РеА описаны: тяжёлый системный некротический васкулит, тромбофлебит, пурпура, сетчатое ливедо и вторичный амилоидоз.

Диагностика

Изменения лабораторных показателей включают: анемию (нечасто), умеренный нейтрофильный лейкоцитоз, увеличение СОЭ, С-реактивного белка, протеинурию, лейкоцитурию, микрогематурию. Ревматоидные факторы и антинуклеарный фактор не выявляются. При исследовании синовиальной жидкости выявляют неспецифические признаки воспаления: низкую вязкость, рыхлый муциновый сгусток, лейкоцитоз с преобладанием нейтрофилов. В отличие от септического артрита, высокий цитоз и снижение концентрации глюкозы не наблюдаются.

Для идентификации триггерных инфекционных агентов используют различные микробиологические, иммунологические и молекулярно-биологические методы (см. ниже). Необходимо отметить, что для диагностики персистирующей хламидийной инфекции методы прямой и непрямой иммунофлуоресценции малоэффективны, поскольку в их основе лежит обнаружение светящихся комплексов антигенов возбудителя — МОМР и ЛПС, находящихся на поверхности ЭТ, расположенных внеклеточно. При персистенции продукция МОМР и ЛПС блокирована, поскольку патоген

находится внутриклеточно, а ЭТ выявляются лишь в 8,2% случаев. Метод культуры клеток также малоинформативен, так как в одном пассаже хламидии при персистирующей инфекции, как правило, не выделяются вследствие неинфекционности и непродуктивности aberrantных включений. Поэтому в настоящее время для определения персистентных форм хламидий оптимальными являются молекулярно-генетические методы на основе амплификации нуклеиновых кислот (полимеразная цепная реакция — ПЦР, в т.ч. в режиме реального времени, ПЦР с обратной транскрипцией, амплификация с вытеснением цепи), чувствительность и специфичность которых крайне высоки и достигают 97 и 99,5%, соответственно.

Учитывая высокую вероятность сопутствующей инфекции, целесообразно исследование на ВИЧ, гепатиты В и С, особенно у больных с УРеА.

С помощью лучевых методов диагностики в случаях затяжного или хронического течения могут быть выявлены: околоуставной остеопороз, изменения в области пораженных энтезисов (тендопериоститы, «рыхлые» пяточные шпоры), сужение суставных щелей и асимметричные эрозии, преимущественно в мелких суставах стоп. При хроническом течении у носителей HLA-B27 в 40–60% случаев обнаруживают признаки одного или двухстороннего сакроилиита.

Диагностические критерии

Общепринятых критериев диагноза РеА не существует. Ниже представлен проект диагностических критериев РеА, разработанных коллективом российских экспертов [8].

Большие критерии

1. Артрит (необходимо наличие двух из трёх характеристик):

- асимметричный;
- поражение ограниченного числа суставов (преимущественно нижних конечностей)¹;
- поражение нижних конечностей.

2. Предшествующая клинически выраженная инфекция (наличие одного из двух проявлений):

- уретрит/цервицит², предшествующий артриту в течение 8 нед.;
- энтерит³, предшествующий артриту в течение 6 нед.

Малый критерий

Лабораторное подтверждение триггерных инфекций, вызванных (один из двух вариантов):

- а) *Chlamydia trachomatis*⁴;
- б) энтеробактерии⁵.

Диагноз определённого РеА устанавливается при наличии обоих больших критериев и соответствующего малого критерия

Диагноз вероятного РеА устанавливается при наличии обоих больших критериев или при наличии первого большого критерия и малого критерия.

Примечание

¹ Число поражённых суставов редко превышает 6, чаще отмечается моно- или олигоартрит.

² Уретрит (дизурия, выделения из уретры или лейкоцитурия — не менее 8–10 лейкоцитов в поле зрения в первой порции утренней мочи), цервицит (диагностируется гинекологом).

³ Кратковременная (не более 1 нед.) диарея или учащение стула и изменение его консистенции (неоформленный, кашицеобразный).

⁴ Доказанное инфицирование. Наиболее специфичным является метод выделения хламидий из уретры/шейки матки или суставных тканей в культуре клеток (дополнительные исследования не требуются). В случае отрицательного результата или невозможности провести исследование).

А. Клинически выраженный уретрит/цервицит — положительный результат соскоба уретры/шейки матки, полученный методами прямой иммунофлуоресценции (ПИФ) или полимеразной (ПЦР)/лигазной (ЛЦР) цепной реакции.

Б. Бессимптомный уретрит/цервицит:

— положительный результат соскоба уретры/шейки матки, полученный двумя методами (ПИФ и ПЦР/ЛЦР),

или

— положительный результат соскоба уретры/шейки матки, полученный методом ПИФ, и положительный результат ПЦР клеточного осадка мочи,

или

— положительный результат соскоба уретры/шейки матки, полученный методом ПИФ, и положительный результат серологического исследования с использованием видоспецифических антисывороток трёх классов иммуноглобулинов ($IgG \geq 1:32$ + диагностические титры IgA или IgM),

или

— положительный результат соскоба уретры/шейки матки, полученный методом ПЦР/ЛЦР, и положительный результат серологического исследования с использованием видоспецифических антисывороток трёх классов иммуноглобулинов ($IgG \geq 1:32$ + диагностические титры IgA или IgM).

*В. Вероятное инфицирование предполагается в случае отсутствия симптомов уретрита/цервицита и отрицательного результата выявления хламидий (или их антигенов) в урогенитальной сфере, но при наличии диагностических титров видоспецифических антител к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке крови ($IgG \geq 1:32$ + IgA или IgM) и/или положительного результата исследования синовиальной жидкости или ткани методами*

ПИФ/ПЦР. В таких случаях следует учитывать возможность других локализаций хламидийной инфекции.

⁵ Доказанное инфицирование: выделение *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri* при посеве кала. В случае отрицательного результата:

А. Клинически выраженный энтерит

— повышение титров антител в сыворотке крови не менее чем в 2 раза (иммуноферментный анализ, реакция непрямой агглютинации)

Б. Атипичная клиника поражения желудочно-кишечного тракта

— повышение титров антител в сыворотке крови не менее чем в 3 раза (иммуноферментный анализ, реакция непрямой агглютинации), особенно в случае значимой динамики

В. Вероятное инфицирование (в случае отсутствия клинических признаков поражения желудочно-кишечного тракта): повышение в сыворотке крови титров антител IgG и IgA (или IgM) не менее чем в 2 раза или повышение титров антител в реакции по Видалу не менее чем в 2 раза (требуются повторные исследования, поиск других локализаций этих инфекций).

Дифференциальный диагноз РеА проводят с инфекционным артритом, другими серонегативными СА, подагрой, ревматоидным артритом, болезнью Лайма, прочими воспалительными заболеваниями суставов.

Лечение

Роль антибактериальной терапии при урогенном РеА на сегодняшний день остаётся предметом дискуссий. Диапазон мнений о целесообразности её применения чрезвычайно широк и колеблется от необходимости длительного курса лечения (в течение нескольких месяцев) до полного отрицания. Однако современные данные свидетельствуют о том, что раннее лечение триггерной урогенной инфекции может предотвратить инициацию и персистенцию последующего артрита. Так, в ретроспективном исследовании на 109 пациентах, получавших антибиотикотерапию против *C. trachomatis*, риск последующего артрита был снижен с 37% до 10% [9]. Назначение такой терапии приводит к обратному развитию симптоматики хламидий-индуцированного РеА, ремиссии заболевания и улучшению отдалённого прогноза [10].

Признано целесообразным раннее назначение антибиотиков при остром РеА, ассоциированным с хламидийной инфекцией. Следует от-

Таблица 3. Антибактериальная терапия урогенитального хламидиоза при РеА

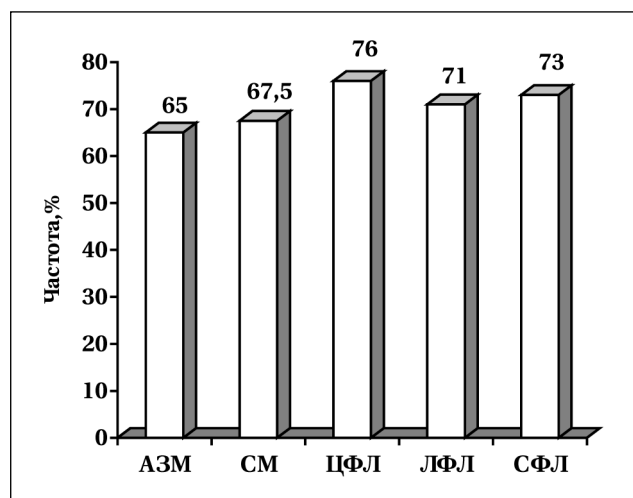
Препараты	Суточная доза	Длительность, дни
Средства выбора		
Макролиды:		
— азитромицин	1,0 г в 1-й день, затем 0,5 г в 1 приём	29
— кларитромицин	0,5 г в 2 приёма	30
— спирамицин	9 млн ЕД в 3 приёма	28
— рокситромицин	0,3 г в 2 приёма	30
— эритромицин	2,0 г в 4 приёма	30
Тетрациклины:		
— доксициклин	0,3 г в 2 приёма	30
Альтернативные средства		
Фторхинолоны:		
— ципрофлоксацин	1500 мг в 2 приёма	28
— офлоксацин	600 мг в 2 приёма	28
— ломефлоксацин	400–800 мг в 1 или в 2 приёма	28
— спарфлоксацин	400 мг в 1-й день, затем 200 мг в 1 приём	28

метить, что санация организма больного РеА от хламидийной инфекции представляет собой достаточно сложную задачу. Показано, что при УРеА практически у всех больных воспалительный процесс в урогенитальном тракте не ограничивается уретрой, а распространяется на вышележащие его отделы, что значительно затрудняет санацию этого очага [11]. Данное обстоятельство в определённой степени может служить объяснением того, что 7–10 дневные курсы антибиотикотерапии, применяемые для лечения неосложнённого урогенитального хламидиоза, совершенно не эффективны при РеА, ассоциированным с хламидийной инфекцией. Однако даже при адекватной длительной антимикробной терапии частота бактериологических неудач при РеА может достигать 40%, что, по всей видимости, связано с биологическими особенностями возбудителя. Как указывалось выше, носители видовых признаков хламидий — ЭТ — метаболически не активны, существуют во внеклеточной среде и могут неопределённо долгое время находиться в состоянии покоя. Более того, у пациентов с РеА, которые ранее уже лечились антибиотиками, возможно развитие персистирующей инфекции, когда изначально метаболически активные РТ, локализуясь внутри клетки, останавливаются на определённом этапе развития и не превращаются в ЭТ. Эти промежуточные формы, по сравнению с обычными, имеют меньшие размеры и не чувствительны к действию антибиотиков.

В НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой в течение более чем 25-летнего периода времени для лечения урогенитального хламидиоза при РеА в качестве препаратов выбора применяют антибиотики из групп макролидов или тетрациклинов (табл. 3), назначаемые в течение 28–30 дней. При непереносимости или неэффективности указанных препаратов назначают фторхинолоны. Как свидетельствует накопленный опыт (рисунок), частота эрадикации *C. trachomatis* у больных РеА колеблется от 65 до 76%, что является весьма действенным стимулом к постоянному поиску

новых схем и методов лечения данной инфекции у этих пациентов.

В целом, признавая необходимость длительного применения антибиотиков при РеА, ассоциированным с хламидийной инфекцией, следует отметить, что единого мнения в отношении схем лечения в мировой литературе нет. Финскими авторами показано, что среди больных урогенным РеА, принимавших ципрофлоксацин 1000 мг/сут. в течение 3 мес., в дальнейшем на протяжении 4–7-летнего периода наблюдения хронические воспалительные ревматические заболевания, ассоциированные с HLA-B27, развивались значимо реже по сравнению с пациентами, получавшими плацебо (8 и 41%, соответственно, $p=0,006$) [12]. Поскольку хламидии в aberrantном состоянии устойчивы к традиционной антибактериальной монотерапии, для получения значимого эффекта целесообразна комбинация антибиотиков, направленных на различные метаболические процессы бактерий [13]. В связи с этим, многообеща-



Эффективность антибактериальной терапии урогенитального хламидиоза при РеА.

Примечание. АЗМ — азитромицин; СМ — спирамицин; ЦФЛ — ципрофлоксацин; ЛФЛ — ломефлоксацин; СФЛ — спарфлоксацин.

ющими представляются результаты исследования J. Carter и соавт., полученные в ходе 9-месячного проспективного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования. Эффективность терапии доксициклином в комбинации с рифампицином (12 больных) или азитромицином в комбинации с рифампицином (15) сравнивали с приёмом плацебо (15). Назначение рифампицина было продиктовано хорошей клеточной пенетрацией препарата (с учётом того, что хламидии являются облигатным внутриклеточным патогеном), а также влиянием на хламидийные гены транскрипции, включая HSP. Комбинированная терапия продемонстрировала высокую эффективность по сравнению с плацебо в плане 20% улучшения, по крайней мере, 4 из 6 параметров заболевания (63 и 20%, соответственно, $p=0,01$). К концу 6-го месяца лечения эрадикация хламидий по результатам ПЦР была более высокой в группах антибиотикотерапии по сравнению с плацебо-контролем (76 и 33%, соответственно, $p=0,057$). Отсутствие значимых различий в последнем случае, вероятно, объясняется малым числом больных [14]. Несомненно, эти данные должны быть подтверждены в других исследованиях, на более крупных выборках пациентов. Кроме того, представляется чрезвычайно важным проведение дальнейших исследований, направленных на поиск более эффективной комбинации антибиотиков с отработкой дозы и длительности лечения [15]. В то же время общепризнано, что назначение антибиотиков при энтерогенном РеА является нерациональным.

Во избежание некорректных результатов, контрольное исследование на хламидиоз осуществляют не ранее, чем через 3–4 нед. после окончания курса антибиотикотерапии.

До завершения лечения и проведения контрольного исследования всем пациентам с УРеА рекомендуют использовать презерватив. Половые партнеры этих больных должны пройти обследование у гинеколога или уролога и при необходимости получить соответствующее лечение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ford D.K. Natural history of arthritis following venereal urethritis. *Ann Rheum Dis* 1953; 12 (3): 177–197.
2. Csonka G.W. Significance of sacro-iliitis in Reiter's disease. *Br J Vener Dis* 1959; 35: 77–80.
3. Ahvonen P., Sievers K., Aho K. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Acta Rheumatol Scand* 1969; 5: 232–253.
4. Panush R.S., Wallace D.J., Dorff R.E., Engleman E.P. Retraction of the suggestion to use the term «Reiter's syndrome» sixty-five years later: the legacy of Reiter, a war criminal, should not be eponymic honor but rather condemnation. *Arthritis Rheum* 2007; 56 (2): 693–694.
5. Hannu T. Reactive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011; 25 (3): 347–357. doi: 10.1016/j.berh.2011.01.018
6. Inman R.D. Reactive arthritis. In: M.L. Hochberg, A.J. Silman, J.S. Smolen, M.E. Weinblatt, M.H. Weisman, editots. *Rheumatology*. 6th ed. Philadelphia: Mosby; 2015; 928–940.
7. Zeidler H., Hudson A.P. New insights into Chlamydia and arthritis. Promise of a cure? *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 637–644. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204110
8. Азабабова Э.Р., Бунчук Н.В., Шубин С.В. и др. Критерии диагноза реактивных артритов (проект). Научно-практическая ревматология. — 2003. — № 3. — С. 82–83. / Agababova E.R., Bunchuk N.V., Shubin S.V. i dr. Kriterii diagnoza reaktivnykh artritov (proekt). *Nauchno-prakticheskaya Revmatologiya* 2003; 3: 82–83. [in Russian]
9. Bardin T., Enel C., Cornelis F. et al. Antibiotic treatment of venereal disease and Reiter's syndrome in a Greenland population. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 190–194.
10. Lassila K., Laasonen L., Leirisalo-Repo M. Antibiotic treatment and long term prognosis of reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 655.
11. Ковалев Ю.Н., Ильин Н.И. Болезнь Рейтера. Челябинск, Вариант-книга, 1993. — 240 с. / Kovalev Yu.N., Il'in N.I. Bolezn' Reitera. Chelyabinsk, Variant-kniga, 1993; 240. [in Russian]
12. Yli-Kerttula T., Luukkainen R., Yli-Kerttula U. et al. Effect of a three month course of ciprofloxacin on the late prognosis of reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 880–884.
13. Luccino B., Spinelli F.R., Perricone C. et al. Reactive arthritis: current treatment challenges and future perspectives. *Clin Exp Rheumatol* 2019; 37; 1065–1076.

В отечественной литературе широко обсуждается возможность применения медикаментозной иммунокоррекции (индукторы интерферона, полиоксидоний, иммунофан и т. д.) в лечении урогенитального хламидиоза. Однако их эффективность и безопасность (в т. ч. у больных РеА) не подтверждены данными рандомизированных контролируемых исследований. В связи с этим, дать какие-либо рекомендации по их применению при УРеА не представляется возможным.

Для лечения поражения суставов применяют нестероидные противовоспалительные препараты (диклофенак, нимесулид, мелоксикам) в стандартных суточных дозах, а также глюкокортикоиды (бетаметазон, триамсинолон), которые вводят внутрисуставно или периартикулярно. При наличии выраженных прогностически неблагоприятных системных проявлений (нефрит, кардит и др.) глюкокортикоиды назначают внутрь в средних дозах. При хроническом течении РеА назначают сульфасалазин, метотрексат, азатиоприн. Имеются данные об успешном применении отдельных представителей из групп генно-инженерных биологических препаратов при резистентных к терапии хронических вариантах РеА, однако небольшое число наблюдений пока не позволяет дать объективную оценку этому методу лечения [16, 17].

При стихании активности артрита в лечебный план включают реабилитационные мероприятия: физиотерапию, массаж, лечебную физкультуру, санаторно-курортное лечение.

Прогноз

У 80% больных полное выздоровление отмечается в течение 6–12 мес. Рецидивы часто связаны с повторным инфицированием. В 20% случаев возможна хронизация процесса. Описаны случаи летальных исходов, обусловленных развитием амилоидоза или тяжёлым поражением сердца.

14. *Carter J.D., Espinosa L.R., Inman R.D. et al* Combination antibiotics as a treatment for chronic Chlamydia-induced reactive arthritis: a double-blind, placebo-controlled, prospective trial. *Arthritis Rheum* 2010; 62 (5): 1298–1307. doi: 10.1002/art.27394
15. *Zeidler H., Hudson A.P.* Chlamydia-Induced Reactive Arthritis: Disappearing Entity or Lack of Research? *Current Rheumatology Reports* 2019; 21: 63. <https://doi.org/10.1007/s11926-019-0863-4>.
16. *Zeng H., Luo B., Zhang Yu. et al.* Treatment of reactive arthritis with biological agents: a review. *Bioscience Reports* 2020; 40 BSR20191927. <https://doi.org/10.1042/BSR20191927>.
17. *Wendling D., Prati C., Chouk M., Verhoeven F.* Reactive arthritis: treatment challenges and future perspectives. *Curr Rheumatol Rep* 2020; 22 (7): 29. doi:10.1007/s11926-020-00904-9.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

Балабанова Римма Михайловна — д. м. н., проф., вед. н. с. лаборатории медико-социальных проблем ревматологии ФБГНУ НИИР им. В. А. Насоновой

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: journal-gnca@yandex.ru или размещаются ЧЕРЕЗ САЙТ журнала после регистрации в личном кабинете автора. Рукописи статей в 1 экз. направляются по адресу: Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия», ул. Нагатинская, д. 3а, 117105. 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 статьи, инициалы, фамилии авторов, наименования учреждений всех авторов.

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. В конце статьи приводятся «Сведения об авторах»: фамилия, имя, отчество полностью, учёная степень, звание, должность, место работы. Для автора, ответственного за переписку, указываются: почтовый адрес для корреспонденции, e-mail и телефон.

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 ри-

сунка 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 приведённых 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), чётко выделяются подстрочные и надстрочные индексы; в случае цифр и букв, сходных по написанию (0 — цифра, О — буква), должны быть сделаны соответствующие пометки.

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

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

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

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

13. Цитируемые источники литературы во всех видах публикаций нумеруются в порядке их упоминания в тексте статьи арабскими цифрами и заключаются в квадратные скобки. В пристатейном списке литературы каждый источник следует помещать с новой строки под порядковым номером. Количество цитируемых работ в оригинальных статьях и лекциях допускается до 40 источников, в обзорах — до 100 источников. В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. 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, издательство, год, количество страниц.

Недопустимо сокращать название статьи и название отечественного журнала. Название англоязычных журналов следует приводить в сокращении в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine, если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название.

Оформление списка литературы должно удовлетворять требованиям РИНЦ и международных баз данных. В связи с этим, в ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице. То есть, библиографические описания ссылок на русскоязычные источники должны состоять из двух частей: русскоязычной и латиноязычной (подряд). При этом сначала следует приводить русскоязычную часть описания, затем — латиноязычную (через слеш). Желательно вставлять Doi статьи.

Таким образом, если статья написана на латинице, то она должна быть процитирована в оригинальном виде:

Lang P.O., Michel J.P., Zekry D. Frailty syndrome: A transitional state in a dynamic process. Gerontology 2009; 55 (5): 539–549.

Если статья написана на кириллице и у статьи есть официальный перевод названия, его нужно вставить в квадратных скобках после оригинального написания библиографической ссылки на источник. Если нет официального перевода, то нужно привести транслитерацию всей ссылки сразу после ссылки в оригинальном исполнении. В конце ссылки в квадратных скобках вставляется in Russian, без точки в конце:

Ткачева О.Н., Рунихина Н.К., Остапенко В.С. Валидация опросника для скрининга синдрома старческой астении в амбулаторной практике. Успехи геронтологии. — 2017. — Т. — 30. — №2. — С.236–242. / Tkacheva O.N., Runikhina N.K., Ostapenko V.S. Validacija oprosnika dlja skrininga sindroma starcheskoj astenii v ambulatornoj praktike. Uspekhi gerontologii 2017; 30 (2): 236–242. [in Russian]

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. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

17. Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

Противовирусный препарат

МНН Риамиловир

ТРИАЗАВИРИН[®]



*Грипп теперь
не страшен с ним!*

ТРИАЗАВИРИН – оригинальный препарат группы азолоазинов. Препарат этиотропного действия с широким спектром противовирусной активности.

ТРИАЗАВИРИН рекомендован Министерством здравоохранения России в качестве препарата с прямым противовирусным действием при лечении гриппа в амбулаторных и стационарных условиях*.

* Клинические рекомендации Минздрава РФ Грипп у взрослых, 2017 год

(343) 270-75-71, 270-75-00
www.triazavirin.ru
Info@triazavirin.ru



ЗАВОД МЕДСИНТЕЗ

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МЕНЯЕТ ВСЁ

 **Рифаксимин-α (альфа) —**
кристаллическая форма рифаксимины
с минимальным всасыванием¹



БОЛЕЕ
1000
ИССЛЕДОВАНИЙ,
ДОКАЗАВШИХ
**ЭФФЕКТИВНОСТЬ
И БЕЗОПАСНОСТЬ²**



КРАТКАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ПРЕПАРАТЕ АЛЬФА НОРМИКС®

Таблетки, покрытые плёночной оболочкой. Рег. номер: ЛС-001993. Гранулы для приготовления суспензии для приёма внутрь. Рег. номер: ЛС-001994. Каждая таблетка, покрытая плёночной оболочкой, содержит: Активное вещество: рифаксимин с полиморфной структурой альфа 200 мг. Гранулы для приготовления суспензии для приёма внутрь в 1 флаконе (60 мл) содержат: Активное вещество: рифаксимин с полиморфной структурой альфа 1,2 г. ОПИСАНИЕ: Круглые, двояковыпуклые таблетки розового цвета, покрытые плёночной оболочкой. Фармакотерапевтическая группа: антибиотик, рифаксимин. Код АТХ: [A07AA11]. Альфа Нормикс®, рифаксимин в полиморфной форме альфа, антибиотик широкого спектра действия из группы рифамицина, проявляет бактерицидные свойства в отношении чувствительных бактерий. ПРЕПАРАТ СНИЖАЕТ: образование бактериями аммиака и других токсических соединений; повышенную пролиферацию бактерий; присутствие в дивертикуле ободочной кишки бактерий; антигенный стимул, который может инициировать или постоянно поддерживать хроническое воспаление кишечника; риск инфекционных осложнений при колоректальных хирургических вмешательствах. Развитие резистентности к рифаксимины обусловлено обратимым повреждением гена groV, который кодирует бактериальную РНК-полимеразу. Рифаксимин практически не всасывается при приёме внутрь (<1%). При повторном применении у здоровых добровольцев и у пациентов с поврежденной слизистой кишечника, при воспалительных заболеваниях концентрация в плазме очень низкая (<10 нг/мл). Выводится из организма в неизменённом виде кишечником (96,9% от принятой дозы). Обнаруживаемый в моче, рифаксимин составляет не более 0,025% от принятой внутрь дозы. Фармакокинетика рифаксимины у детей не изучалась. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ: Лечение желудочно-кишечных инфекций, диареи путешественников, синдрома избыточного роста микроорганизмов в кишечнике, печёночной энцефалопатии, симптоматического неосложнённого дивертикулёзного заболевания ободочной кишки и хронического воспаления кишечника. Профилактика инфекционных осложнений при колоректальных хирургических вмешательствах. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ: Повышенная чувствительность к рифаксимины или другим рифамицинам или к любому из компонентов, входящих в состав препарата; диарея, сопровождающаяся лихорадкой и жидким стулом с кровью; кишечная непроходимость; тяжёлое язвенное поражение кишечника; детский возраст до 12 лет; наследственная непереносимость фруктозы, нарушение всасывания глюкозы-галактозы, недостаточность сахаразы-изомальтазы. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ: Принимать внутрь, запивая стаканом воды, независимо от приёма пищи. Лечение диареи: 1 таб. по 200 мг или 10 мл суспензии каждые 6 часов. Печёночная энцефалопатия: 2 таблетки по 200 мг или 20 мл суспензии каждые 8 часов. Профилактика послеоперационных осложнений при колоректальных хирургических вмешательствах: 2 таблетки по 200 мг или 20 мл суспензии каждые 12 часов. Профилактику проводят за 3 дня до операции. Синдром избыточного бактериального роста: 2 таблетки по 200 мг каждые 8–12 часов. Симптоматический неосложнённый дивертикулёз: 1–2 таблетки по 200 мг или от 10 до 20 мл суспензии каждые 8–12 часов. Хронические воспалительные заболевания кишечника: 1–2 таблетки по 200 мг или от 10 до 20 мл суспензии каждые 8–12 часов. Продолжительность лечения Альфа Нормиксом не должна превышать 7 дней. Повторный курс лечения следует проводить не ранее чем через 20–40 дней. По рекомендации врача могут быть изменены дозы и частота их приёма. УСЛОВИЯ ОТПУСКА ИЗ АПТЕК: По рецепту. Производитель Альфасигма С.п.А., Италия, Виа Э. Ферми 1, 65020 Аланно (Пескара), Италия / Via E. Fermi 1, 65020 Alanno (Pescara), Italy. Для получения полной информации о назначении обращайтесь в ООО «Альфасигма Рус», Россия, по адресу: 125009, Москва, Тверская улица, д. 22/2, корп. 1, 4 этаж, пом. VII, комн. 1. Тел. +7 (495) 225-3626; эл. адрес: info.ru@alfasigma.com. Патент № RU 2270200 от 20.02.2006.

1. Инструкция по медицинскому применению препарата Альфа Нормикс®.
2. <https://doctorasyou.com/main/#chart>