

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА ОБОЛОЧЕК НА АКТИВНОСТЬ
АНТИБИОТИКОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К *E. COLI***

Выпускная квалификационная работа
обучающейся по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология
очной формы обучения, группы 07001316
Савиновой Натальи Сергеевны

Научный руководитель
ассистент кафедры
биотехнологии и
микробиологии,
Клюева В.В.

БЕЛГОРОД 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Общая характеристика микроорганизма <i>Escherichia coli</i>	5
1.1.1. Устойчивость <i>E. coli</i> к антибиотикам.....	6
1.2. Антибиотики цефалоспоринового ряда.....	8
1.2.1. Резистентность микроорганизмов к действию цефалоспоринов.....	9
1.2.2. Классификация цефалоспоринов.....	11
1.2.3. Цефазолин.....	13
1.2.4. Цефатоксим.....	14
1.2.5. Цефтриаксон.....	15
1.2.6. Цефепим.....	16
1.3. Наноструктурированные оболочки антибиотиков.....	17
1.3.1. Интерферон.....	17
1.3.2. Полудан.....	21
1.3.3. Альбумин.....	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
2.1. Материалы исследования.....	26
2.2. Методы исследования.....	27
2.2.2. Определение чувствительности <i>Escherichia coli</i> к антибиотикам диско-диффузным методом.....	27
2.2.3. Статистическая обработка цифровых данных.....	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
3.1. Измерение зон ингибирования роста <i>Escherichia coli</i>	32
3.2. Статистическая обработка цифровых данных.....	35
3.2.1. Обработка цифровых данных разностным методом.....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	43
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	45

ВВЕДЕНИЕ

Перспективным способом повышения активности лекарственных препаратов является их механическая обработка в смеси со вспомогательными компонентами. Так как цефалоспориновые антибиотики обладают разнонаправленными иммуномодулирующими свойствами и составляют основу современной антибактериальной терапии вследствие их высокой эффективности и низкой токсичности [24].

В настоящее время ведутся исследования по повышению пролонгированности действия цефалоспориновых антибиотиков путем заключения их в наноструктурированные оболочки.

К изменению эффективности и биодоступности приводит уменьшение ингредиента до микро- и наноразмеров. Самая главная особенность наноструктурированных соединений это возможность построить огромную рабочую поверхность. Основное их использование - это контролируемое освобождение веществ в определенном месте и времени [24].

В данной работе мы использовали следующие цефалоспориновые антибиотики: цефазолин, цефотаксим, цефтриаксон, цефепим.

Цель работы: исследовать влияние различных оболочек на активность антибиотиков по отношению к *E. coli*.

В соответствии с поставленной целью необходимо решить следующие задачи:

- рассчитать средний диаметр зоны подавления роста микроорганизма (*E. coli*) по каждому цефалоспориновому антибиотику.
- провести сравнительный анализ активности нативных антибиотиков и активности антибиотиков в наноструктурированных оболочках по отношению к *E. coli*.

Для достижения поставленной цели, нами был использован диско-диффузный метод определения чувствительности к антибиотикам.

Структура работы: выпускная квалификационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения выводов, списка литературы и приложения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика микроорганизма *Escherichia coli*.

Escherichia coli - это мелкие, размером от 2 до 3 мкм в длину и от 0,5 до 0,8 мкм в ширину, неспороносные, грамотрицательные палочки с немного округлыми концами. Их структура идентична другим грамотрицательным бактериям. В мазках они располагаются хаотично, не образуют спор, жгутики располагаются по всей поверхности бактерии (перитрихиальное расположение). На конце жгутика находится белок FimH, который состоит из взаимосвязанных белковых сегментов, которые закручены тонкой длинной пружиной и упруго вытягиваются под воздействием силы. Эти сегменты соединены в цепочку, и прикрепляется к молекулам сахаров на поверхности.

Основным структурным компонентом клеточной стенки бактерий является гликопептид муреин, построенный из остатков N - ацетилглюкозамина и N - ацетилмурамовой кислоты [4].

Клетки *E. coli* подвижные, иногда неподвижные, перитрих, одиночные или соединены в цепочки. Колонии белые или грязно-белые, гладкие, блестящие, плоские или слегка выпуклые. Хорошо развивается на обычных белковых средах, не развивается на синтетических, минерального азота не усваивает, лимонную кислоту как источник углеродистого питания не усваивает. Желатину не разжижает, молоко быстро свертывает, образует кислоту и газ на глюкозе, левулезе, фруктозе, мальтозе, галактозе, арабинозе, рафинозе, маннате, сорбите, дульците и декстрине, сахарозу не сбраживает, нитраты восстанавливает до нитритов, ацетилметилкарбинола не образует, выделяет индол, издает фекальный запах. Факультативный аэроб, оптимум температуры 30-37 градусов Цельсия. Обычное название – кишечная палочка. Обитает в кишечнике человека и животных, встречается в воде, почве и других субстратах, загрязненных фекалиями. Микроб – комменсал. Проникает в кровяное русло в агониальной стадии болезни, может вызвать инфекцию желчного пузыря, почек, мочевого пузыря и других органов.

Кардинальными отличительными признаками кишечной палочки являются:

- положительная реакция с мелитрот;
- отрицательная реакция Вогес-Проскауера;
- отсутствие роста на цитратных средах;
- образование газа при 45-46 градусах Цельсия на среде Эйкмана-Булира.

Бактерии кишечной палочки при разложении глюкозы образуют углекислоту и водород примерно в равных количествах. Эти газы в жидкой среде определяют конечную реакцию ее, именно кислую по метилроту. Вследствие этого получается красная окраска культур. Цветная реакция на ацетилметилкарбинол установлена впервые Вогес-Проскауером [15].

В условиях анаэробного дыхания *Escherichia coli* образует этанол, лактат, сукцинат, ацетат и углекислый газ в качестве продукта жизнедеятельности. *E. coli* обычно сосуществует с микроорганизмами, которые потребляют водород - например, с метаногенами или бактериями, восстанавливающими сульфат, так как образующийся при анаэробных условиях молекулярный водород мешает образованию указанных выше метаболитов. Кишечная палочка может жить на различных субстратах, к питательным средам неприхотлива [12].

1.1.1. Устойчивость *E. coli* к антибиотикам.

С помощью антибиотиков лечат непосредственно заболевания бактериальной природы. Тем не менее, чувствительность и резистентность к антибиотикам у различных штаммов *E. coli* отличается друг от друга. Являясь грамотрицательным микроорганизмом, эшерихия устойчива ко многим антибиотикам, которые эффективны и действенны против грамположительных микроорганизмов.

Антибиотики, которые могут быть применены для лечения инфекции *Escherichia coli*, включают полусинтетические пенициллины, многие цефалоспорины, азтреонам, триметоприм-сульфаметоксазол, ципрофлоксацин,

нитрофурантоин и аминогликозиды. Резистентность микроорганизмов к антибиотикам является растущей проблемой. В некоторой степени, это происходит в результате чрезмерного использования антибиотиков, но частично это, вероятно, связано с применением антибиотиков в качестве стимуляторов роста в кормах для животных [21].

В исследовании, опубликованном в журнале *Science* в августе 2007 года, было установлено, что скорость приспособительных мутаций у *E. coli* составляет «порядка 10^{-5} на геном, за поколение, что в 1000 раз выше, чем предыдущие оценки». Это открытие может иметь значение для изучения и управления бактериальной резистентностью к антибиотикам. Устойчивые к антибиотикам кишечные палочки могут также передавать гены, ответственные за антибиотикорезистентность, к другим видам бактерий, таким как золотистый стафилококк, с помощью горизонтального переноса генов. Микроорганизм *E. coli* часто несет несколько плазмид с лекарственной устойчивостью, и в условиях стресса способны легко передавать эти плазмиды другим видам. В самом деле, *E. coli* является частым членом биопленки, где существует много видов бактерий в непосредственной близости друг от друга. Это смешение видов позволяет штаммам *E. coli* принимать и передавать плазмиды из других бактерий и обратно. Таким образом, *E. coli* и другие энтеробактерии являются важными резервуарами переводимой резистентности к антибиотикам [12].

Так как штаммы микроорганизмов, производящие бета-лактамазы расширенного спектра, становятся все более распространенными, устойчивость к бета-лактамам антибиотикам стала особенной проблемой в последние несколько десятилетий. Именно эти ферменты бета-лактамазы делают многие пенициллиновые и цефалоспориновые антибиотики неэффективными в качестве терапии. *Escherichia coli* расширенного спектра, продуцирующие бета-лактамазы (ESBL *E. coli*), обладают высокой резистентностью к массе антибиотиков, и инфекции, которые вызваны этими штаммами, трудно поддаются лечению. Во многих случаях, только два пероральных антибиотика и

очень ограниченная группа внутривенных антибиотиков, остаются эффективными.

Различают естественную (природную) и приобретенную устойчивость (резистентность) штаммов микроорганизмов к антимикробным препаратам. Естественная является видоспецифичным или родоспецифичным стабильным признаком. Приобретенная сначала образуется у отдельных штаммов какого-либо вида или рода, а в дальнейшем возможно ее широкое внутри- или межвидовое распространение.

Генетические механизмы формирования антибиотикорезистентности связаны с мутациями микроорганизма, а также с приобретением новой генетической информации в результате таких процессов как: конъюгация, трансдукция, трансформация. Детерминанты устойчивости содержатся в хромосомах или во внехромосомных факторах наследственности - плазмидах [38].

1.2. Антибиотики цефалоспоринового ряда.

Цефалоспорины — это антибиотики, в основе химического строения которых лежит 7-аминоцефалоспориновая кислота. Основными особенностями этих антибиотиков являются широкий спектр действия, высокая бактерицидность, относительно большая по сравнению с пенициллинами устойчивость по отношению к β -лактамазам [32].

Цефалоспорины представляют собой бициклические соединения, которые состоят из β -лактамного и дигидротиазинового колец. Оба кольца и составляют 7-аминоцефалоспориновую кислоту (7-АЦК), которая является общим ядром молекулы цефалоспоринов. При этом трансформация химической структуры 7-АЦК сопровождается существенными изменениями свойств (антибактериальной активности, параметров фармакокинетики и пр.) соответствующего соединения [9].

Антибактериальная активность бета-лактамных антибиотиков, в частности цефалоспоринов, отчасти обусловлена замедлением синтеза

пептидогликана, который является структурной основой микробной стенки. Пептидогликаны представляют собой длинные полисахаридные цепочки со своеобразной сетчатой пространственной конформацией, в которых чередуются остатки N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмураминовой кислоты (NAM). NAG- и NAM-пентапептидные остатки пептидогликанов синтезируются в цитоплазме микробной клетки и переносятся через цитоплазматическую мембрану. Далее эти остатки встраиваются в существующую пептидогликанную сеть (в процессе роста и деления клетки) с участием таких энзимов, как: транспептидаза, карбоксипептидаза, эндопептидаза. Непосредственно эти энзимы, находящиеся в цитоплазматической мембране, являются местом реализации антибактериальной активности (мишенями) бета-лактамовых антибиотиков, в том числе цефалоспоринов; они получили название «пенициллинсвязывающие белки» (penicillin-binding proteins - PBP). В результате образования «длительной» ковалентной связи бета-лактамового антибиотика и PBP последние инактивируются. При этом эффект назначаемого бета-лактамового антибиотика зависит от того, какие PBP инактивируются и какую роль они играют в синтезе пептидогликана и выживании микробной клетки. Важно также отметить, что бактерицидный эффект антибиотиков цефалоспоринового ряда реализуется только в процессе роста и размножения микроорганизмов, тогда как «покоящиеся» клетки неуязвимы для действия антибиотиков [35, 11].

1.2.1. Резистентность микроорганизмов к действию цефалоспоринов.

Резистентность микроорганизмов к действию цефалоспоринов может быть связана с одним из следующих механизмов:

- а) видоизменением (модификация) PBP со снижением аффинности (сродства) к ним цефалоспоринов;
- б) гидролизной инактивацией антибиотика (бета-лактамазами);
- в) нарушением проницаемости внешних структур микробной клетки для антибиотика и затруднением его связывания с «мишенью» - PBP [14].

У грамположительных микроорганизмов цитоплазматическая мембрана определенно прилежит к пептидогликанному матриксу, с связи с чем цефалоспориновые антибиотики довольно легко достигают РВР. В противоположность этому, наружная мембрана грамотрицательных микроорганизмов имеет существенно более сложную «конструкцию»: состоит из липидов, полисахаридов и белков, и это является преградой для проникновения цефалоспоринов в пространство микробной клетки. Цефалоспорины «проникают» сквозь наружную мембрану микробной клетки через пориновые каналы. В связи с этим, естественно, уменьшение проницаемости этих пориновых каналов может привести к формированию устойчивости к антибиотикам [2, 5].

Однако продукция бета-лактамаз является объективно наиболее клинически значимым механизмом развития резистентности грамотрицательных бактерий к цефалоспорином. Эти инактивирующие антибиотики энзимы кодируются хромосомами или плазмидами (плазмиды - фрагменты внехромосомной ДНК, которые размножаются внутри бактерий). Бета-лактамазы широко распространены среди грамотрицательных микроорганизмов, а также производятся рядом грамположительных бактерий (стафилококки). Связывание бета-лактамазы с бета-лактамым антибиотиком катализирует гидролиз «критической» аминной связи лактамного кольца, что и приводит к инаktivации антибиотика [1, 20].

Грамположительные микроорганизмы высвобождают бета-лактамазы прямо во внеклеточное пространство, окружающее их. При этом известно, что большинство цефалоспоринов достаточно устойчиво к гидролизующему действию стафилококковой бета-лактамазы. Поэтому антистафилококковая активность цефалоспоринов зависит в основном от их сродства к эссенциальным стафилококковым РВР. Так, например, цефамицины и цефтазидим, которые являются достаточно бета-лактамазостабильными, демонстрируют низкую антистафилококковую активность из-за низкого сродства к РВР *S. aureus* [6].

1.2.2. Классификация цефалоспоринов.

Антибиотики цефалоспоринового ряда по антибактериальной активности подразделяют на 4 поколения. Цефалоспорины 1-го поколения характеризуются относительно узким спектром антимикробного действия, особенно в отношении грамположительных кокков. Цефалоспорины 2-го поколения показывают промежуточную активность по отношению к грамположительным коккам и более выраженное действие против грамотрицательных бактерий. Несмотря на то, что цефамицины проявляют относительно высокую активность в отношении грамотрицательных аэробных и анаэробных микроорганизмов, их также относят к цефалоспорином 2-го поколения. Цефалоспорины, оказывающие на грамотрицательные микроорганизмы сильное бактерицидное действие, объединены в группу цефалоспоринов 3-го поколения. Часть из них характеризуется ограниченной активностью в отношении грамположительных кокков, особенно чувствительных к метициллину штаммов *S. aureus* [18].

Цефепим и цефпиром (4-е поколение цефалоспоринов) демонстрируют наиболее широкий спектр антимикробной активности, который включает грамположительные кокки и грамотрицательные бактерии (большинство представителей семейства *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*).

Цефалоспорины 1-го поколения обладают высокой активностью против грамположительных кокков и умеренной в отношении *M. catarrhalis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*. Штаммы *Bacteroides fragilis* устойчивы к действию цефалоспоринов 1-го поколения. Препараты этой группы практически неактивны в отношении *H. influenzae*, резистентных к метициллину стафилококков, резистентных к пенициллину пневмококков и энтерококков [21, 14].

Цефалоспорины 2-го поколения, обладающие известной активностью в отношении стафилококков и «неэнтерококковых» стрептококков, также оказывают отчетливое бактерицидное действие на *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *N. meningitidis* и *N. gonorrhoeae*. Отдельные препараты этой группы активны (*in vitro*) против представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Рассматривая Цефалоспорины 2-го поколения, обычно выделяют истинные цефалоспорины и цефамицины (цефокситин, цефотетан, цефметазол). Последние в отличие от истинных цефалоспоринов недостаточно активны в отношении стафилококков и стрептококков, но высокоэффективны против некоторых микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides spp.* и особенно *B. fragilis* [17].

Признаки, по которым характеризуются цефалоспорины 3-го поколения с микробиологической точки зрения:

1. Выраженная антибактериальная активность против энтеробактерий, включая мультиустойчивые проблемные микроорганизмы (*Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*). Однако, из-за беспочвенного широкого использования в последние дни прогрессивных цефалоспоринов 3-го поколения, образовалось широкое распространение грамотрицательных микроорганизмов, которые продуцируют хромосомные бета-лактамазы.

2. Расширенный спектр действия в отношении грамотрицательных микроорганизмов, включая *P. aeruginosa* и *Citrobacter freundii*. Но необходимо учитывать вариабельную резистентность клинических изолятов к данным антибиотикам.

3. Более сильное антимикробное действие на грамотрицательные штаммы абсолютно у всех цефалоспориновых антибиотиков 3-го поколения по сравнению с цефалоспоридами 1-го и 2-го поколений «соседствует» с наиболее слабой активностью в отношении грамположительных кокков (стафилококков) [32].

К снижению эффективности антибиотикотерапии привело чрезмерно активное и не всегда оправданное, использование цефалоспориновых антибиотиков 3-го поколения в химиотерапии различных заболеваний, повлекшее за собой широкое распространение устойчивых микроорганизмов - продуцентов бета-лактамаз (плазмидных и хромосомных). Вследствие этого и были разработаны, а после внедрены в клиническую практику

цефалоспориновые антибиотики 4-го поколения. Кроме цефепима, в эту группу включают: цефпиром, цефклидин, цефквином, цефозоран и др [26].

Цефалоспорины 4-го поколения высокоактивны в отношении широкого круга представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Так, при изучении большого числа клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в Европе, установлено, что активность цефепима (МИК 2 мг/л) существенно превосходит таковую цефалоспоринов 3-го поколения (МИК цефтазидима >64 мг/л, цефотаксима >32 мг/л) [17].

1.2.3. Цефазолин.

Цефазолин - из всех цефалоспориновых антибиотиков 1-го поколения является наименее нефротоксичным препаратом. На грамположительные микроорганизмы, гемофильную палочку, индолотрицательный протей действует менее активно, Золотистый стафилококк, кишечная палочка, клебсиелла к нему в полной мере чувствительны, но на грамположительные штаммы, такие как: гемофильная палочка, индолотрицательный протей, цефазолин действует менее активно. Достаточно продолжительное сохранение терапевтической концентрации в крови (от 8 до 12 часов) - это фармакокинетическая особенность цефазолина. Препарат не метаболизируется в организме. Наибольшие концентрации при парентеральном введении создаются в тканях печени, почек, легких, поджелудочной железе, миокарде, мягких тканях и гное. Концентрация в желчи и желчевыводящих путях превышает таковую в крови. Препарат проникает через плацентарный барьер и в молоко матери [16]. Выводится почками за 24 часа (около 90%) при помощи клубочковой фильтрации и секреции канальцев. Нарушение функции почек замедляет этот процесс.

Взаимодействует со специфическими пенициллинсвязывающими белками на поверхности цитоплазматической мембраны, также он тормозит синтез пептидогликанового слоя клеточной стенки (ингибирует транспептидазу, угнетает образование поперечных сшивок цепочек пептидогликана),

высвобождает аутолитические ферменты клеточной стенки, вызывая ее повреждение и гибель бактерий.

Установлена *in vitro* и подтверждена клинически активность в отношении грамположительных микроорганизмов — *Staphylococcus aureus* (включая пенициллиназопродуцирующие штаммы), *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* (бета-гемолитические стрептококки группы А), *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, ряда грамотрицательных бактерий. Активен также в отношении *Spirochaetaceae* и *Leptospiraceae* [29].

Цефазолин (кефзол) по спектру антибактериальной активности близок к цефалотину (объективно последний более эффективен в отношении *E. coli* и *Klebsiella spp.*). Цефазолин более уязвим для деградирующего действия стафилококковых бета-лактамаз [26].

1.2.4. Цефатоксим.

Цефотаксим (клафоран) активен в отношении *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *Neisseria spp.*, умеренно активен в отношении *S. aureus*. Препарат высокоэффективен против *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.* и других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, не продуцирующих бета-лактамазы. Цефотаксим не проявляет клинически значимой антипсевдомонадной активности [27].

Обладает большим спектром противомикробного действия. Устойчив к 4 (из 5) бета-лактамазам грамотрицательных бактерий и пенициллиназе стафилококков.

Активен в отношении *Staphylococcus aureus*, в том числе вырабатывающих пенициллиназу, *Staphylococcus epidermidis*, некоторых штаммов *Enterococcus spp.*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.*, *Haemophilus influenzae*, включая ампициллинрезистентные штаммы, в том числе штаммов, вырабатывающих пенициллиназу [16].

Может действовать на мультиустойчивые штаммы, резистентные к пенициллинам, цефалоспорином 1-х поколений и аминогликозидам. В отношении грамположительных кокков менее активен, чем цефалоспорины 1-го и 2-го поколения.

Цефотаксим может быть использован вместо соответствующих комбинаций пенициллинов с аминогликозидами. Выводится почками, однако не нефротоксичен [35].

1.2.5. Цефтриаксон.

Цефтриаксон (роцефин) можно охарактеризовать как самый активный цефалоспориновый антибиотик 3-го поколения по отношению к таким микроорганизмам, как: *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*. Препарат обладает уникальными фармакокинетическими характеристиками. По сравнению с большинством цефалоспоринов, период полувыведения которых, определяющий кратность введения, составляет 0,5 - 2 ч, у цефтриаксона этот показатель равен 8 ч. Поэтому препарат можно вводить один раз в сутки [27].

Цефтриаксон и цефотаксим зарекомендовали себя как высокоэффективные препараты при лечении нозокомиальных инфекций, вызываемых чувствительными к ним микроорганизмами (пневмония, раневая инфекция, осложненная инфекция мочевыводящих путей). Однако, если лечение нозокомиальной инфекции начинают эмпирически, т.е. в отсутствие микробиологического диагноза, то следует помнить о возможном участии в развитии инфекционного процесса резистентной к цефалоспорином 3-го поколения микрофлоры (синегнойная палочка, метициллинрезистентные стафилококки - MRSA, энтерококки) [23]. В связи с этим при проведении инициальной эмпирической терапии тяжелой нозокомиальной инфекции, как правило, предполагается сочетанное назначение цефалоспоринов и аминогликозидов [31, 3].

При лечении менингита в педиатрической практике цефтриаксон по эффективности заметно превосходит ранее использовавшиеся с этой целью

комбинации антибиотиков (ампициллин + хлорамфеникол или ампициллин + гентамицин). В настоящее время Цефтриаксон применяют как средство эмпирической терапии менингита у детей и лиц пожилого возраста, а в случае выделения из цереброспинальной жидкости *H. influenzae* этот препарат становится средством выбора. Данные антибиотики также высокоэффективны при менингите, вызванном другими грамотрицательными палочками, за исключением *P. aeruginosa* (препарат выбора - цефтазидим) и *Enterobacter spp.* (препарат выбора - триметоприм/сульфаметоксазол). Цефтриаксон также используют при лечении пневмококкового менингита (в случае устойчивости *S. pneumoniae* к пенициллину) [9].

По сравнению с другими препаратами данной группы цефотаксим обладает более активным антибактериальным действием, и более широким его спектром. Проявляет максимальную активность в отношении стрептококков (кроме энтерококка), умеренную - пневмококка. Активен против индолположительных штаммов протей, гемолитической палочки, а также микроорганизмов, резистентных к ампициллину и хлорамфениколу. На золотистый стафилококк действует менее активно, чем цефамандол. К нему чувствительны госпитальные полиустойчивые штаммы [3].

1.2.6. Цефепим.

На примере препарата цефепим наиболее полно изучена антимикробная активность цефалоспориновых антибиотиков 4-го поколения. Он обладает высокой эффективностью против *Streptococcus spp.* Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) цефепима в отношении *S. pneumoniae* составляет 0,05 мг/л, т.е. сопоставима с антипневмококковой активностью цефотаксима и превосходит таковую цефтазидима. Цефепим по сравнению с цефтазидимом более эффективен и в отношении пиогенного стрептококка [34, 2].

Резистентные к метициллину штаммы *S. aureus* высокочувствительны к действию цефепима.

Цефепим сочетает высокую активность в отношении грамположительных кокков (метициллинчувствительный золотистый стафилококк, стрептококки) и грамотрицательных бактерий, проявляя наибольшую активность против цитробактера, энтеробактерий, клебсиелл [17].

Эффективность цефепима в отношении синегнойной палочки на порядок выше цефтазидима. Кроме того, препарат активно подавляет штаммы, устойчивые к цефтазидиму [33]. За счет быстрого проникновения в бактериальную клетку, высокого сродства к пенициллин связывающим белкам, резистентность к бета-лактамазам, включая хромосомные, устойчивость к антибиотикам развивается значительно медленнее, чем к другим препаратам антимикробного действия.

Концентрация цефепима в плазме и в большинстве тканей сохраняется выше минимальной ингибирующей в отношении основных чувствительных микроорганизмов при 12-часовых интервалах между введениями препарата. Цефепим выделяется почками. При клиренсе креатинина менее 30 мл/мин его доза требует коррекции и доработки [37].

1.3. Наноструктурированные оболочки антибиотиков.

1.3.1. Интерферон.

Цефалоспориновые антибиотики, заключенные в наноструктурированные оболочки представляют собой ядро нанокапсулы - непосредственно сам антибиотик, а также поверхностные оболочки, такие как полудан, альбумин, интерферон при соотношении оболочка:ядро 3:1.

Интерфероны (ИФН) — группа аутогенных гликопротеинов. Их биомеханизм действия связан с одновременным противовирусным эффектом, т. е. активацией клеточных генов, в результате которой синтезируются белки, которые ингибируют синтез вирусной ДНК (РНК) и обладают иммуномодулирующим эффектом. Они способны увеличивать экспрессию антигенов НЛА на клеточных мембранах и усиливать эффективность цитотоксических Т-клеток и естественных киллеров. ИФН бывают двух типов.

Первый тип, действующий как ингибиторы репликации вируса и оказывающий непосредственно противовирусный эффект. К нему относят 22 различных подтипа ИФН- α и один подтип ИФН- β . И второй тип, проявляющий иммуномодуляторную активность (ИФН- γ) [10].

Интерфероны (ИФН) представляют собой наиболее изученную группу цитокинов (медиаторов иммунитета). Они зашифрованы в геноме клеток позвоночных и представлены семейством белков, которые обладают противовирусной, иммуномодулирующей, антипролиферативной и другими видами биоактивности.

Интерфероны относят соответственно к полифункциональным биорегуляторам и гомеостатическим агентам. Образование и действие быстореагирующей системы ИФН можно рассматривать как важнейший механизм врожденного (естественного) иммунитета, который играет ключевую роль в провоспалительном и противовоспалительном цитокиническом каскаде. Разнообразие физиологических функций интерферонов указывает на то, что они осуществляют контрольно-регулирующую роль в сохранении гомеостаза [13].

Система ИФН состоит из последующих этапов, которые представляют собой своеобразную цепную реакцию организма в ответ на внедрение чужеродной информации. В настоящее время полностью расшифрована сигнальная система клеток, которая обеспечивает передачу сигнала с рецепторов интерферонов в клеточное ядро и геном с активацией семейства генов, необходимым для образования клеточной защиты от вирусных и бактериальных инфекций.

1 этап. Индукция или «включение» системы приводит к дерепрессии генов ИФН, транскрипции их и-РНК с их последующей трансляцией. Это достаточно быстрый этап взаимодействия между внешними сигналами и клеткой. Сигнальная система передачи сформирована так, что через 30-40 мин. фиксируются признаки ответа клеточного генома.

2 этап. Продукция - синтез клетками ИФН альфа-, бета-, гамма- и других типов и выделение их в окружающую среду. Продукция ИФН происходит сразу после окончания стадии индукции. Уже через 2-3 часа в периферической крови наблюдается накопление функционально активных молекул ИФН. Через 6-8 часов концентрация ИФН в периферической крови достигает максимума.

3 этап. Действие - защита окружающих клеток от чужеродной информации (вирусы, бактерии и т.д.) вновь сформировавшимися ИФН. При многочисленных инфекциях ключевую роль играет генерализованный ответ организма на инфекционный агент. В этом ответе важная функция принадлежит дендритным клеткам. Концентрация интерферонов в периферической крови достигает уровня, который обеспечивает высокий уровень защиты от вирусной инфекции, в том лишь случае, когда дендритные клетки эффективно отвечают на соответствующий стимул.

4 этап. Эффекты - противовирусный, иммуномодулирующий, антиопухолерогенный, радиопротективный сильно дифференцированный этап и имеет особенности проявления. Например, при инфекционных процессах необходим быстрый ответ и протиборство механизмам подавления регуляции синтеза ИФН вирус-специфическими белками. В механизмах противоопухолевой активности ИФН особое значение имеет специфическая активация цитотоксических Т-лимфоцитов. ИФН- γ и распознавание этими клетками опухоеспецифических антигенов выполняют непосредственно главную роль [10].

Наряду с противовирусной активностью интерфероны проявляют антипролиферативный и иммуномодулирующий эффекты, оказывают воздействие на рост и дифференцировку клеток организма.

Основные биологические эффекты интерферонов:

·Подавление развития и размножения внутриклеточных инфекционных агентов вирусной и невирусной природы (хламидии, риккетсии, бактерии, простейшие)

- Антипролиферативная активность
- Антимутагенный эффект
- Антитоксическое действие
- Радиопротективный эффект
- Регуляция продукции антител
- Стимуляция макрофагов, усиление фагоцитоза
- Усиление цитотоксического действия сенсibilизированных лимфоцитов, направленного на клетки-мишени
- Активация естественных киллерных клеток
- Стимуляция высвобождения гистамина базофилами
- Индукция синтеза простагландинов.

ИФН проявляют некоторые виды активности также как лимфокины и иммуномодуляторы. Интерфероны I типа, действующие чаще всего как ингибиторы репликации вирусов в клетке, реализуют свой эффект и стимулируют образование рибосомами клеток хозяина клеточных энзимов, которые замедляют продукцию вирусов, нарушая трансляцию вирусной мРНК и синтез белков вируса [10].

ИФН образуют большинство видов животных, однако, их активность проявляется определенно, то есть только у того вида животных, в которых вырабатываются.

ИФН вызывают индукцию трех ферментов:

- протеинкиназы, нарушающей начальный этап формирования пептидной цепи;
- олигоизоденилат синтетазы, активирующей РНК-азу, которая разрушает вирусную РНК;
- фосфодиэстеразы, разрушающей конечные нуклеотиды тРНК, что приводит к нарушению элонгации пептида [7].

1.3.2. Полудан.

Полудан - это действенный иммуностимулирующий препарат из группы интерфероногенов. Интерфероногены (индукторы синтеза интерферона) - это вещества, которые благотворно влияют на эндогенную выработку интерферона с помощью собственных клеток, увеличивая количество интерферона и повышая противoinфекционную сопротивляемость организма.

Состав полудана: активными веществами является полирибонуклеотидный комплекс (калиевые соли полирибоадениловой и полирибоурициловой кислот): калия полирибоаденилат (Polyadenilic acid) - 0,1 мг; калия полирибоуридилат (Polyuridilic acid) - 0,110 мг. Также в препарате, в качестве вспомогательных веществ, присутствуют: хлорид натрия — 8,5 мг; гидрофосфат натрия (натрий фосфорнокислый двузамещенный) — 2 мг; дигидрофосфат калия (калий фосфорнокислый однозамещенный безводный) — 0,410 мг [22].

Действующие вещества (полирибонуклеотиды), получены строго биосинтетическим методом, и активируют выработку интерферона лейкоцитами крови и в тканях.

Полудан - иммуномодулятор, противовирусное средство. Он стимулирует выработку эндогенного интерферона, препятствует размножению вирусов, усиливает эффективность естественных киллерных клеток. Применяется для лечения аденовирусного и герпетического конъюнктивита, кератоконъюнктивита, кератита, кератоиридоциклита, кератоувеита, иридоциклита, хориоретинита, неврита зрительного нерва вирусной этиологии.

Полудан является биосинтетическим полирибонуклеотидным комплексом полиадениловой и полиурициловой кислот (в эквимольных соотношениях) [25].

Полудан воздействует на выработку эндогенного интерферона (в основном альфа-интерферона, в меньшей степени бета-интерферона и гамма-интерферона) в клетках и тканях организма. Формирование интерферона

препятствует размножению вируса в клетке. Инстилляции и субконъюнктивальное введение полудана способствует образованию эндогенного интерферона в сыворотке крови и в слезной жидкости больных офтальмогерпесом. Через 3 часа после введения полудана в сыворотке крови и в слезной жидкости определяется интерферон. Высокий уровень интерферона (110 ЕД/мл в крови и 75 ЕД/мл в слезной жидкости) фиксируется ежедневными введениями полудана на протяжении всего курса. На 2-й день после прекращения введения практически не определяется (титр не превышает 10 ЕД/мл) [22, 8].

Полудан усиливает активность естественных киллерных клеток, исходно сниженных у иммунокомпетентных клеток. Исследования влияния полудана на иммунологические показатели в системе *in vitro* показывают, что препарат стимулирует естественную цитотоксичность, а также действие других иммунокомпетентных клеток, в регуляции активности которых большую роль играет интерферон.

Полудан совместим с антибиотиками и средствами для лечения вирусных инфекций [13].

Полудан усиливает выработку интерферона в организме человека, преимущественно альфа-интерферона, а также прочих факторов жидкостного иммунитета. Соли полирибоуридиловой и полирибоадениловой кислоты - активные вещества препарата. Данные компоненты оказывают прямое влияние на вирусы гриппа, а также возбудителей различных респираторных или офтальмологических вирусных заболеваний.

В лейкоцитах периферической крови, а также в тканях и органах, которые содержат лимфоидные элементы полудан индуцирует синтез интерферона. Высокий уровень интерферона поддерживается ежедневными введениями в течение всего курса. Обладает прямым противовирусным действием в отношении гриппа и других ОРВИ. Модулирует ответ цитокинов при инфицировании клеток вирусом [22].

1.3.3. Альбумин.

Альбумин - основной белок организма, синтезирующийся в печени. Он имеет много важных незаменимых функций. Препараты альбумина используют в интенсивной терапии, во время оперативных вмешательств, при травмах, ожогах, заболеваниях почек, печени и других. Прорабатываются преимущества альбумина при применении в клинической практике [25].

Период его биологического полураспада составляет 14 суток. В норме синтез альбумина соответствует его катаболизму и составляет ежедневно до 10%. Всего в организме взрослого человека содержится 200-300 грамм альбумина, из которых только треть находится внутрисосудисто, а остальные две трети, находятся экстравазально. Альбумин, находящийся внутрисосудисто, постоянно обменивается и взаимодействует со своим внесосудистым пулом: большинство нормальных венул содержат крупные поры, проницательные для альбумина, по которым он попадает в интерстицию. У взрослого человека транскапиллярная проницательность альбумина составляет 5%/час (у новорожденных - 18,4%/год), возвращение альбумина с интерстицией в кровь осуществляется через систему лимфатических узлов. Роль альбумина в организме поливалентная. Функций, которые выполняет альбумин:

- сорбционно-транспортная,
- гемодинамическая
- функция основного белкового резерва организма.

Альбумин - один из белков плазмы, являющийся хорошо растворимым, за счет большого количества групп на поверхности его молекулы, способных к ионизации. Концентрация его растворов может достигать 30%. Изоэлектрическая точка альбумина находится при более низких значениях pH (между 4,7 и 5,5), чем в большинстве плазменных белков [13].

Альбумин и низкомолекулярные декстраны сходны по механизму действия, находят употребление в клинике для обеспечения эффективной стабильности суспензии эритроцитов в плазме, зависящей от соотношения

между плазматическими коллоидами высокой и низкой молекулярной массы. Это основывается на том, что при образовании сгустка в плазме крови определяется более высокая концентрация таких высокомолекулярных белков как фибриноген, альфа-1, альфа-2 и гамма-глобулины, а также альфа- и бета-протеиды, а содержание альбумина снижено. Увеличение соотношения фракций глобулина и фибриногена относительно к альбумину приводит к нарушению стабильности и ведет к образованию агрегатов эритроцитов. Известно, что сгусток эритроцитов вызывается сочетаемыми нарушениями геодинамики и реологическими свойствами крови. Доказано, что вазоконстрикция, которая обуславливает уменьшение органного кровотока, является одним из условий снижения микроциркуляции практически всегда сопровождается состояниями, сопровождающиеся кровопотерей, кровезамещением и оперативным вмешательством. Нужно оценивать изменения белков крови у больных одновременно с определением объема кровопотери и объема циркулирующей крови (ОЦК), так нарушение суспензионной стабильности формируется изменениями альбуминно-глобулинового соотношения в сторону увеличения глобулинов и снижение альбуминов.

Способность альбумина к связыванию различных химических веществ, обусловлена наличием активных полярных и гидрофобных участков на поверхности молекулы. Она делает его одним из важных белков, которые обеспечивают многочисленные обменные процессы. Альбумин переносит молекулы жиров, желчных кислот, медикаментов, красителей и тому подобных.

Следовательно, альбумин может связывать органические и неорганические вещества, имеющие различные свойства - гидрофильные и гидрофобные, кислотные и щелочные. Биологическая оценка данных свойств говорит о том, что ведущая его роль - транспортная, а именно поддержание гомеостаза путем регулирования уровней эндогенных и экзогенных веществ [8, 25].

Основным критерием качества препаратов альбумина является стабильность их физико-химических свойств при хранении, что определяется

по образованию в растворе агрегированных молекул - димеров и, особенно, полимеров. Агрегаты, обнаруженные во всех препаратах альбумина, при норме отсутствуют в циркулирующей крови, и образуются при его производстве и хранении. Стабильность готовых форм альбумина определяется:

- в первую очередь, качеством плазмы, использованной для его производства;

- качеством фракционирования,

- степенью очистки,

- соблюдением температурных параметров на каждом этапе производства,

- количеством повторных стадий производственного процесса (повторное осаждение, нагрев - могут существенно снизить стабильность раствора альбумина);

- температурным режимом хранения (установлено, что раствор альбумина является стабильным при температуре от +2 °С до +8 °С, входящим в противоречие с мнением, о возможности длительного хранения до 5 лет) при комнатной температуре без изменений его фармакологических свойств.

Наличие примесей полимерного белка приводит к негативному воздействию на стабильность растворов альбумина и может вызвать появление осадка в процессе хранения препарата. Перед применением раствора альбумина необходимо убедиться в его прозрачности, отсутствии взвеси, осадка, других механических примесей [7].

Альбумин выполняет следующие важные функции:

- связывает и переносит важные соединения и вещества в органах и тканях организма (микро- и макроэлементы, витамины, гормоны, липиды, билирубин, кислоты);

- поддерживает нормальное давление в плазме крови. Благодаря этому в организме, имеющем оптимальное количество альбумина, жидкость остается в

кровенном русле, не проходит через стенки сосудов в мышечную и соединительную ткань и не вызывает отеки;

- резервирование белковых элементов. Альбумин хранит в себе множество незаменимых аминокислот, присутствие которых необходимо для здорового состояния организма. Во время длительного голодания эти запасы расходуются [13].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материал исследования.

Экспериментальная часть выпускной квалификационной работы была выполнена на базе кафедры биотехнологии и микробиологии Института инженерных технологий и естественных наук ФГАОУ ВО НИУ БелГУ.

Для нашего исследования в качестве объекта был выбран представитель семейства *Enterobacteriaceae* - *Escherichia coli*, т. к. этот микроорганизм является одним из самых распространенных и изученных, а также имеет разнообразие возможных механизмов резистентности к антибиотикам.

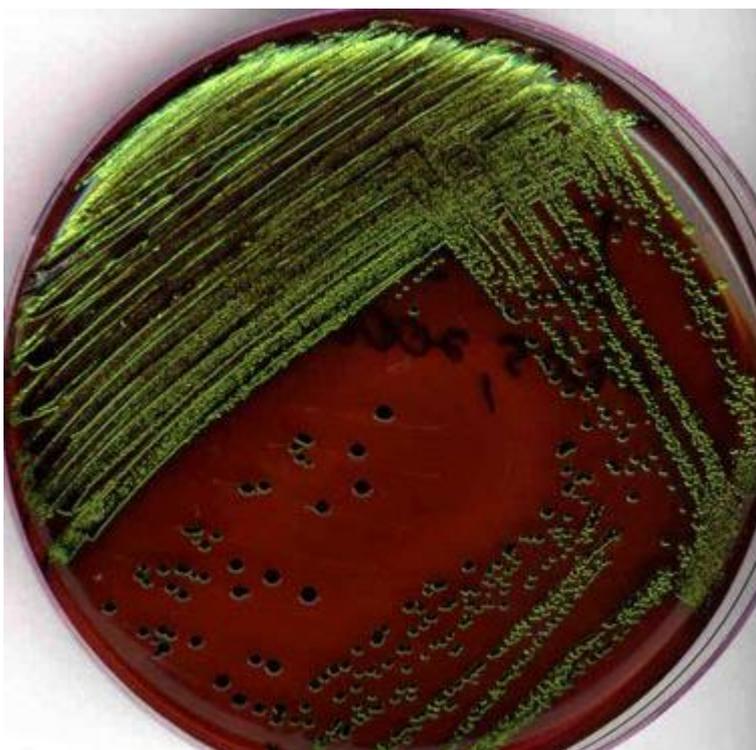


Рис.2.1.1. Тест-объект *Escherichia coli*.

В данной работе мы использовали следующие цефалоспориновые антибиотики: цефазолин, цефотаксим, цефтриаксон, цефепим, непосредственно в нативной форме, а также в наноструктурированных оболочках, а именно: в альбумине, интерфероне и полудане.

2.2. Методы исследования.

2.2.1. Определение чувствительности *Escherichia coli* к антибиотикам диско-диффузным методом.

Изучение чувствительности микроорганизмов на примере *E. coli* к цефалоспориновым антибиотикам цефепиму, цефазолину, цефтриаксону и цефотаксиму в нативной форме, а также в интерфероне, полудане и альбумине проводили диско-диффузным методом. Этот метод основан на способности антибиотиков диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

Приготовление питательных сред.

Для микробиологического эксперимента нами была приготовлена питательная среда ГРМ (Рис.).

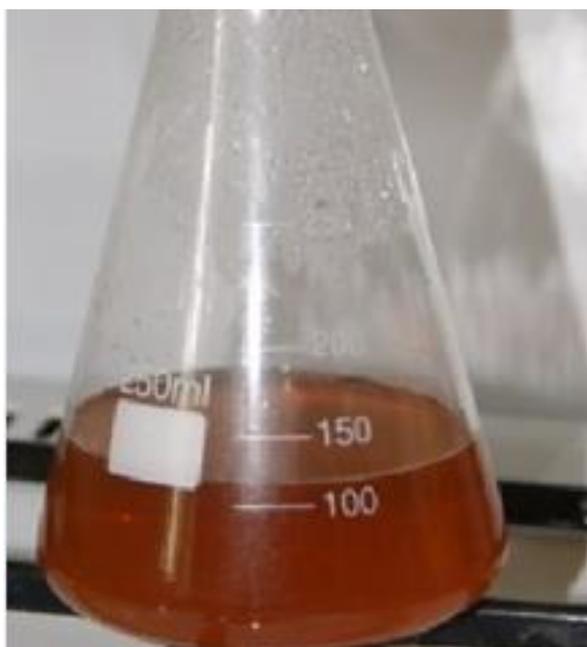


Рис.2.1 Питательная среда ГРМ для культивирования.

ГРМ - универсальная питательная среда, предназначенная для культивирования широкого спектра различных микроорганизмов, таких как: энтеробактерии, синегнойная палочка, стафилококки и др. Представляет собой мелкодисперсный гигроскопичный порошок светло-желтого цвета.

Для приготовления питательной среды в коническую колбу наливали 250 мл дистиллированной воды и добавляли 12,5 г сухого порошка ГРМ. Количество среды рассчитывали по пропорции: на 1 л дистиллированной воды требуется 50 г агара ГРМ. Среду при этом добавляли постепенно, медленно помешивая, до образования однородной массы. Колбу закрывали пробкой и подогревали на плитке до начала кипения, а затем стерилизовали автоклавированием при температуре 120 °С в течение 20 мин (фаза выдержки).

Приготовленную и простерилизованную питательную среду ГРМ разливали под пламенем горелки (в радиусе 10-15 см) в заранее подготовленные чашки Петри, которые также были простерилизованы в сухожаровом шкафу при температуре 170°С в течение 2 часов. Слегка покачивая чашки, распределяли среду равномерно по их дну и оставляли стоять на ровной поверхности.

Посев Escherichia coli на питательную среду ГРМ.

Использовали метод газона, который заключается в следующем: микробиологическим дозатором под пламенем горелки наносили 100 мкл жидкой культуры *E. coli* на поверхность среды и тщательно распределяли жидкость по всей поверхности чашки стерильным шпателем.

Приготовление растворов антибиотиков.

На аналитических весах взвешивали 0,1 г сухого порошка каждого антибиотика. Далее разбавляли каждую взвесь в пробирке с 10 мл подготовленной стерилизованной воды, тщательно взболтав их на вортексе. Концентрация растворов антибиотиков была 0,01г/мл в объеме 30 мкл.

Микробиологическим дозатором отбирали 30 мкл каждого подготовленного раствора антибиотиков и наносили на бумажные диски,

заранее стерилизованные в сухожаровом шкафу. После этого диски помещали на поверхность среды, засеянную культурой *E. coli*, стерильным пинцетом на одинаковом расстоянии друг от друга. Затем чашки ставили в термостат вверх дном и инкубировали посев при 37°C 24 часа.

Для каждого антибиотика мы использовали по 3 чашки Петри, в каждой из которых помещали по 3 бумажных диска (Рис.2).



Рис. 2 Зоны подавления роста микроорганизма (*E. coli*) вокруг дисков с антибиотиком (цефотаксим).

Измерения зон ингибирования роста Escherichia coli.

Для учета результатов с помощью линейки измеряли диаметры зон подавления роста микроорганизма (*E. coli*) вокруг дисков, пропитанных антибиотиками. Результаты заносили в таблицы.

2.2.2. Статистическая обработка цифровых данных.

Математическую статистику, прежде всего, используют для планирования опытов. Её основная задача - это определение достоверности полученных результатов. В любом эксперименте должно быть достаточное количество вариантов и повторностей. Все варианты должны находиться в одинаковых условиях.

Методами статистической обработки результатов опыта обычно называют математические приемы, формулы, способы количественных расчетов, с помощью которых показатели, получаемые в ходе эксперимента, можно обобщать, приводить в систему, выявляя закономерности.

В проведенном эксперименте определяли достоверность различий между средними арифметическими исследуемых выборок (образцов). Данные задачи решали с помощью применения критерия Стьюдента (t). Критерий Стьюдента (t) - это показатель, позволяющий судить о надежности и достоверности выводов, подтверждающих или опровергающих рабочую гипотезу.

Математическую статистику можно применять лишь в правильно спланированных и проведенных опытах. Если опыты не отвечают необходимым условиям, их следует немедленно браковать. Перед статистической обработкой все данные необходимо соответствующим образом подготовить: округлить, вычислить средние арифметические, а также выбраковать сомнительные данные [19].

Для статистической обработки полученных цифровых данных мы применили два метода: метод описательной статистики и разностный метод.

В ходе исследования нами были рассчитаны статистические показатели, характерные для малых выборок.

- средние арифметические;
- ошибки среднего;
- ошибки разности;
- стандартные отклонения;

- критерий Стьюдента (t).

Данные расчеты проводились нами в программе Microsoft Office Excel 2010 с помощью описательной статистики.

Обработка полученных данных разностным методом включала несколько этапов:

1. Вычисление среднего арифметического значения по всем повторностям (x_{cp});
2. Вычисление разности (d) между данными по повторностям;
3. Определение среднего арифметического разности (d_{cp});
4. Расчет отклонения между каждой разностью и средним значением ($d - d_{cp}$);
5. Возведение данного отклонения в квадрат и его суммирование:

$$(\sum(d - d_{cp})^2);$$

6. Вычисление ошибок разностей (S_d) по следующим формулам:

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)}}; \quad S_{d(1-3)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)}}.$$

7. Вычисление критерия Стьюдента фактического:

$$t_{(1-2)} = (x_{2cp} - x_{1cp}) / S_{d(1-2)}; \quad t_{(1-3)} = (x_{3cp} - x_{1cp}) / S_{d(1-3)}$$

Фактический критерий мы сравнивали с теоретическим и делали выводы, пользуясь следующим правилом: если фактический критерий Стьюдента равен теоретическому значению или больше него, то разность между вариантами существенна [19].

Теоретические значения критериев мы брали из таблицы числа степеней свободы, которое вычисляли по формуле:

$$v = (n_1 - 1) + (n_2 - 1)$$

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Измерение зон ингибирования роста *Escherichia coli*.

В данной экспериментальной работе мы использовали такие цефалоспориновые антибиотики, как: цефотаксим, цефазолин, цефепим и цефтриаксон в нативной форме, а также эти же антибиотики в наноструктурированных оболочках: в альбумине, полудане и интерфероне.

Посевы культуры кишечной палочки производились на питательную среду ГРМ газоном.

Нами было проведено микробиологическое исследование чувствительности микроорганизмов на примере *E. coli* к каждому из вышеперечисленных антибиотиков диско - диффузным методом.

Таблица 3.1.1.

Зона ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефепима в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефепим(1)	Цефепим в полудане(1.1)
1	14	4
2	14	5
3	15	5
4	16	6
5	16	7
6	16	7
7	18	8
8	19	9
Среднее	$14,33 \pm 0,183$	$6,375 \pm 0,183$

Таблица 3.1.2.

Зона ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефепима в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефепим(1)	Цефепим в интерфероне(1.2)
------------	------------	----------------------------

1	14	5
2	14	7
3	15	9
4	16	10
5	16	10
6	16	10
7	18	12
8	19	13
Среднее	14,33 ± 0,38	9,5 ± 0,38

Таблица 3.1.3.

Зона ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефазолина в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефазолин(2)	Цефазолин в интерфероне(2.1)
1	10	10
2	11	10
3	12	11
4	12	11
5	12	11
6	13	13
7	14	13
8	17	15
Среднее	11,44 ± 0,227	11,75 ± 0,227

Таблица 3.1.4.

Зона ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефотаксима в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефотаксим(3)	Цефотаксим в интерфероне(3.1)
1	16	0
2	17	0
3	17	0
4	18	0
5	21	20
6	25	20
7	20	21
8	26	24
Среднее	18,75 ± 2,95	10,625 ± 2,95

Таблица 3.1.5.

Зона ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефотаксима в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефотаксим(3)	Цефотаксим в полудане(3.2)
1	16	10
2	17	11
3	17	13
4	18	14
5	21	14
6	25	16
7	20	17
8	26	17
Среднее	$20 \pm 0,8$	$14 \pm 0,8$

Таблица 3.1.6.

Зона ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефтриаксона в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефтриаксон(4)	Цефтриаксон в полудане(4.1)
1	18	26
2	19	26
3	19	26
4	19	26
5	20	26
6	20	26
7	20	26
8	21	26
Среднее	$19,5 \pm 0,93$	$26 \pm 0,93$

Таблица 3.1.7.

Зона ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефтриаксона в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефтриаксон(4)	Цефтриаксон в альбумине(4.2)
1	18	14
2	19	15
3	19	15

4	19	15
5	20	15
6	20	20
7	20	20
8	21	25
Среднее	19,5 ± 1,1	17,375 ± 1,1

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что биологическая активность нативных антибиотиков существенно различается. Максимальная активность проявилась у цефотаксима, минимальная - у цефазолина (разница существенна на уровне $p < 0,001$), а у цефепима зона ингибирования занимает промежуточное положение. Активность нативного цефтриаксона близка к цефотаксиму, разница между ними не существенна.

Анализ цифровых данных показывает, что эффективность модифицированных форм антибиотиков не всегда приводит к повышению их антимикробной активности. Только цефтриаксон в оболочке полудана и альбумина при 24-часовой экспозиции привел к достоверному повышению активности антибиотика, а цефазолин в интерфероне и цефтриаксон в альбумине существенно не отличались от нативных форм.

В приложении 1 приведены фотографии, характеризующие зоны подавления роста микроорганизма *E. coli*.

3.2. Статистическая обработка цифровых данных.

3.2.1. Обработка цифровых данных разностным методом.

Таблица 3.2.1.1.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефепима в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефепим(1)	Цефепим в полудане(1.1)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	14	4	1	0,0375	0,001406
2	14	5	0,9	-0,0625	0,003906

3	15	5	1	0,0375	0,001406
4	16	6	1	0,0375	0,001406
5	16	7	0,9	-0,0625	0,003906
6	16	7	0,9	-0,0625	0,003906
7	18	8	1	0,0375	0,001406
8	19	9	1	0,0375	0,001406
Среднее	14,33333	6,375	0,9625	0	0,002344

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)^2}} = \sqrt{\frac{1,875}{56}} = 0,183$$

$$t_{d(1-2)} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{d(1-2)}} = \frac{14,333 - 6,375}{0,183} = 43,49$$

$$V = (8-1) + (8-1) = 14$$

На самом высоком уровне значимости 0,001, $t_{st} = 4,14$, т. е. $t_{d(1-2)} > t_{st}$, следовательно данные достоверны.

Таблица 3.2.1.2.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефепима в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефепим(1)	Цефепим в интерфероне(1.2)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	14	5	0,9	0,25	0,0625
2	14	7	0,7	0,05	0,0025
3	15	9	0,6	-0,05	0,0025
4	16	10	0,6	-0,05	0,0025
5	16	10	0,6	-0,05	0,0025
6	16	10	0,6	-0,05	0,0025
7	18	12	0,6	-0,05	0,0025
8	19	13	0,6	-0,05	0,0025
Среднее	14,33333	9,5	0,65	0	0,01

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)^2}} = \sqrt{\frac{8}{56}} = 0,38$$

$$t_{d(1-2)} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{d(1-2)}} = \frac{14,33 - 9,5}{0,38} = 12,71$$

На самом высоком уровне значимости 0,001, $t_{st} = 4,14$,т. е. $t_{d(1-2)} > t_{st}$, следовательно данные достоверны.

Таблица 3.2.1.3.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефазолина в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефазолин(2)	Цефазолин в интерфероне(2.1)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	10	10	0	0,305556	0,093364198
2	11	10	1	1,305556	1,704475309
3	12	11	1	1,305556	1,704475309
4	12	11	1	1,305556	1,704475309
5	12	11	1	1,305556	1,704475309
6	13	13	0	0,305556	0,093364198
7	14	13	1	1,305556	1,704475309
8	17	15	2	2,305556	5,31558642
Среднее	11,44444	11,75	-0,3055	1,180556	1,75308642

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)^2}} = \sqrt{\frac{2,875}{56}} = 0,227$$

$$t_{d(1-2)} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{d(1-2)}} = \frac{11,75 - 11,44}{0,227} = 1,37$$

На самом высоком уровне значимости 0,001, $t_{st} = 4,14$,т. е. $t_{d(1-2)} < t_{st}$, следовательно данные недостоверны.

Таблица 3.2.1.4.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефотаксима в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефотаксим(3)	Цефотаксим в интерфероне(3.1)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	16	0	16	7,875	62,01563
2	17	0	17	8,875	78,76563
3	17	0	17	8,875	78,76563
4	18	0	18	9,875	97,51563
5	21	20	1	-7,125	50,76563
6	25	20	5	-3,125	9,765625
7	20	21	-1	-9,125	83,26563

8	16	24	-8	-16,125	260,0156
Среднее	18,75	10,625	8,125	0	90,10938

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)^2}} = \sqrt{\frac{485,88}{56}} = 2,95$$

$$t_{d(1-2)} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{d(1-2)}} = \frac{20 - 10,625}{2,95} = 3,18$$

На самом высоком уровне значимости 0,001, $t_{st} = 4,14$, т. е. $t_{d(1-2)} < t_{st}$, следовательно данные недостоверны.

Таблица 3.2.1.5.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефотаксима в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефотаксим(3)	Цефотаксим в полудане(3.2)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	16	10	6	0	0
2	17	11	6	0	0
3	17	13	4	-2	4
4	18	14	4	-2	4
5	21	14	7	1	1
6	25	16	9	3	9
7	20	17	3	-3	9
8	26	17	9	3	9
Среднее	20	14	6	0	4,5

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)^2}} = \sqrt{\frac{36}{56}} = 0,8$$

$$t_{d(1-2)} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{d(1-2)}} = \frac{20 - 14}{0,8} = 7,5$$

На самом высоком уровне значимости 0,001, $t_{st} = 4,14$, т. е. $t_{d(1-2)} > t_{st}$, следовательно данные достоверны.

Таблица 3.2.1.6.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефтриаксона в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефтриаксон(4)	Цефтриаксон в полудане(4.1)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	18	26	8	1,5	2,25
2	19	26	7	0,5	0,25
3	19	26	7	6,5	42,25
4	19	26	7	0,5	0,25
5	20	26	6	-0,5	0,25
6	20	26	6	-0,5	0,25
7	20	26	6	-0,5	0,25
8	21	26	5	-1,5	2,25
Среднее	19,5	26	6,5	0,75	6

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)^2}} = \sqrt{\frac{48}{56}} = 0,93$$

$$t_{d(1-2)} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{d(1-2)}} = \frac{26 - 19,5}{0,93} = 6,99$$

На самом высоком уровне значимости 0,001, $t_{st} = 4,14$, т. е. $t_{d(1-2)} > t_{st}$, следовательно данные достоверны.

Таблица 3.2.1.7.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефтриаксона в нативной и наноструктурированной форме(мм)

Повторения	Цефтриаксон(4)	Цефтриаксон в альбумине(4.1)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	18	14	4	1,875	3,515625
2	19	15	4	1,875	3,515625
3	19	15	4	1,875	3,515625
4	19	15	4	1,875	3,515625
5	20	15	5	2,875	8,265625
6	20	20	0	-2,125	4,515625
7	20	20	0	-2,125	4,515625
8	21	25	-4	-6,125	37,51563
Среднее	19,5	17,375	2,125	0	8,609375

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)^2}} = \sqrt{\frac{68,875}{56}} = 1,1$$

$$t_{d(1-2)} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{d(1-2)}} = \frac{19,5 - 17,4}{1,11} = 1,89$$

На самом высоком уровне значимости 0,001, $t_{st} = 4,14$, т. е. $t_{d(1-2)} < t_{st}$, следовательно данные недостоверны.

Таблица 3.2.1.8.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефепима в полудане и интерфероне(мм)

Повторения	Цефепим в полудане(1.1)	Цефепим в интерфероне(1.2)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	4	5	1	-2,125	4,515625
2	5	7	2	-1,125	1,265625
3	5	9	4	0,875	0,765625
4	6	10	4	0,875	0,765625
5	7	10	3	-0,125	0,015625
6	7	10	3	0,875	0,765625
7	8	12	4	0,875	0,765625
8	9	13	4	0,875	0,765625
среднее	6,375	9,5	3,125	0,125	1,203125

Таблица 3.2.1.9.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефотаксима в интерфероне и полудане(мм)

Повторения	Цефотаксим в интерфероне(3.1)	Цефотаксим в полудане(3.2)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	0	10	10	6,625	43,89063
2	0	11	11	7,625	58,14063
3	0	13	13	9,625	92,64063
4	0	14	14	10,625	112,8906
5	20	14	-6	-9,375	87,89063
6	20	16	-4	-7,375	54,39063
7	21	17	-4	-7,375	54,39063
8	24	17	-7	-10,37	107,6406
среднее	10,625	14	3,375	0	76,48438

Таблица 3.2.1.10.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности цефтриаксона в полудане и альбумине(мм)

Повторения	Цефтриаксон в полудане(4.1)	Цефтриаксон в альбумине(4.2)	d	d-dcp	(d-dcp) ²
1	26	14	-12	-3,375	11,39063
2	26	15	-11	-2,375	5,640625
3	26	15	-11	-2,375	5,640625
4	26	15	-11	-2,375	5,640625
5	26	15	-11	-2,375	5,640625
6	26	20	-6	2,625	6,890625
7	26	20	-6	2,625	6,890625
8	26	25	-1	7,625	58,14063
среднее	26	17,375	-8,625	0	13,23438

Таблица 3.2.1.11.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении зон ингибирования *E. coli* как показатель биологической активности антибиотиков в нативной и наноструктурированной форме(мм)

№	Вариант антибиотика	Оболочка	Зона ингибирования(мм)	Ошибка среднего, S_x	Ошибка разности, Sd	Критерий Стьюдента фактический, td
1	Цефепим	-	14,33	0,88		
		Полудан _(1.1)	6,37	0,6	Sd _(1-1.1) = 0,183	td _(1-1.1) = 43,49
		Интерферон _(1.2)	9,5	0,9	Sd _(1-1.2) = 0,38	td _(1-1.2) = 12,71
					Sd _(1.1-1.2) = 0,415	td _(1.1-1.2) = 7,53
2	Цефазолин	-	11,44	0,88		
		Интерферон _(2.1)	11,75	0,62	Sd _(2-2.1) = 0,227	td _(2-2.1) = 1,37
3	Цефотаксим	-	20	1,51		
		Интерферон _(3.1)	10,62	Нет данных	Sd _(3-3.1) = 2,95	td _(3-3.1) = 3,18
		Полудан _(3.2)	14	0,93	Sd _(3-3.2) = 0,8	td _(3-3.2) = 7,5
					Sd _(3.1-3.2) = 3,3	td _(3.1-3.2) = 1,02
4	Цефтриаксон	-	19,5	0,73		
		Полудан _(4.1)	26	0	Sd _(4-4.1) = 0,93	td _(4-4.1) = 6,99
		Альбумин _(4.2)	17,37	1,38	Sd _(4-4.2) = 1,1	td _(4-4.2) = 1,89
					Sd _(4.1-4.2) = 1,375	td _(4.1-4.2) = 6,27

Критерий Стьюдента фактический между цефепимом нативным и цефепимом в полудане составляет 43,49, что больше табличного значения $t=4,14$, а значит разница между ними существенна.

Критерий Стьюдента фактический между цефепимом нативным и цефепимом в интерфероне составляет 12,71, что больше табличного значения $t=4,14$, а значит разница между ними существенна.

Критерий Стьюдента фактический между цефотаксимом нативным и цефотаксимом в полудане составляет 7,5, что больше табличного значения $t=4,14$, а значит разница между ними существенна.

Критерий Стьюдента фактический между цефтриаксоном нативным и цефтриаксоном в полудане составляет 6,99, что больше табличного значения $t=4,14$, а значит разница между ними существенна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы исследовали следующие цефалоспориновые антибиотики: цефепим, цефазолин, цефтриаксон и цефотаксим - в нативной форме, а также в наноструктурированных оболочках: альбумине, полудане и интерфероне. Диско-диффузным методом определили чувствительность тест-объекта *E. coli* к этим антибиотикам. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что различия биологической активности нативных форм антибиотиков существенны. Максимальная активность проявилась у цефотаксима, минимальная - у цефазолина (разница существенна на уровне $p < 0,001$), а у цефепима зона ингибирования занимает промежуточное положение. Активность нативного цефтриаксона близка к цефотаксиму, разница между ними не существенна.

Исследование показывает, что эффективность модифицированных форм антибиотиков не всегда приводит к повышению их антимикробной активности. Только цефтриаксон в оболочке полудана и альбумина при 24-часовой экспозиции привел к достоверному повышению активности антибиотика, а цефазолин в интерфероне и цефтриаксон в альбумине существенно не отличались от нативных форм.

Цефотаксим в интерфероне и полудане, а также цефепим в полудане и интерфероне снизили биологическую активность нативных форм при суточной экспозиции *Escherichia coli*. Объяснение этому можно найти в структуре модифицированных антибиотиков, где частицы размером от 87 до 92 нм, растворившиеся за сутки экспозиции кишечной палочки, не проявили весь потенциал антибиотика. Можно предположить на основании литературных данных, что более крупные частицы проявят свое действие при увеличении экспозиции.

Анализ цифровых данных, полученных с помощью метода описательной статистики позволил вычислить параметры среднего значения, стандартной ошибки, стандартного отклонения, а с помощью разностного метода, удалось

определить достоверность различий между исследуемыми выборками с помощью критерия Стьюдента.

В ходе проделанной работы сформулированы следующие выводы:

1. Рассчитали средний диаметр зоны подавления роста микроорганизма (*E. coli*) по каждому цефалоспориновому антибиотику. Максимальный диаметр зоны ингибирования был обнаружен у цефотаксима нативного (20мм), минимальный диаметр - у цефепима в полудане(6,37мм).
2. Провели сравнительный анализ активности нативных антибиотиков и активности антибиотиков в наноструктурированных оболочках по отношению к *E. coli*. Микробиологическое исследование наноструктурированных антибиотиков диско-диффузным методом с тест-объектом *E. coli* показало, что антимикробная эффективность исследованных модифицированных форм антибиотиков различна и зависит от природы оболочки. В ряде случаев она повышается по сравнению с нативными формами антибиотиков при 24-часовой экспозиции тест-объекта при температуре 37 оС (цефотаксим и цефтриаксон в полудане), в других вариантах существенно не изменяется (цефазолин в интерфероне и цефтриаксон в альбумине). Цефепим и цефотаксим в полудане и интерфероне в первые сутки экспозиции снизили биологическую активность по сравнению с нативными формами, что предположительно связано с коротким периодом инкубации объекта, испытывавшего влияние лишь мелких (быстрорастворимых) фракций наночастиц, а более крупные должны проявить потенциал антибиотика с увеличением экспозиции биотеста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арзамасцев А.П. Фармацевтическая химия. - М.: 1ЭОТАР-МЕД. 2004. - 640 с.
2. Балткайс Я.Я., Фатеев В.А. Взаимодействие лекарственных веществ. - М.: «Медицина», 1991. - 303 с.
3. Белобородова Н.В., Богданов М.Б., Черненькая Т.В. Алгоритмы антибиотикотерапии: Руководство для врачей. - М.: Антэя 2000, 2000. - 192 с.
4. Борисов Л.Б. Энтеропатогенные кишечные палочки и их фаги, Л., 1976.
5. Вакуленко С.Б. Механизм действия бета-лактамных антибиотиков и устойчивость к ним микроорганизмов//Антибиот. и мед. биотехнол. - 1987. - №4. - С.294-302.
6. Горман М., Морин Р.Б. Создание новых беталактамных антибиотиков// Антибиот. и химиотер. - 1990. - №12. - С.39-42.
7. Добрица В.П., Ботерашвили Н.М., Добрица Е.В. Современные иммуномодуляторы для клинического применения Руководство для врачей Политехника 2001 г.
8. Дранник Г. Н. и др. Иммуностропные препараты Здоровье. — 1994 г.
9. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. - М.: Издательство МГУ, Наука, 2004. - 528 с.
10. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств).-М., Изд. «Геотар -Медиа».-2005.-356 с.
11. Жуков-Вережников, Н. Н. Многотомное руководство по микробиологии клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. Том 4. Клиника, патология, диагностика и лечение инфекционных и инвазионных болезней. Антибиотики / Н.Н. Жуков-Вережников. - М.: Книга по Требованию, 2012. - 658 с.
12. Кауфман Ф. Семейство кишечных бактерий, пер. с англ., М., 1959.

13. Кисленко В.Н. Иммунологические методы диагностики, новосибирск-2010. -235 с.
14. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология, 2008. -121 с.
15. Красильников Н. А. Определитель бактерий и актиномицетов. – Москва, 1949. – 457 с.
16. Кукес В.Г. Клиническая фармакология. - М: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. - 528 с.
17. Лукьянчук В.Д. Механизмы действия лекарственных средств. - Луганск, 1997. -81 с.
18. Машковский М. Д. Лекарственные средства. — М.; Медицина, 1998. 688 с.
19. Моисейченко В.Ф. Основы научных исследований в агрономии/ Моисейченко В.Ф., Трифонова М.Ф., Заверюха А.Х., Ещенко В.Е. - М.: Колос, 1996. - 336 с.
20. Навашин, С. М. Справочник по антибиотикам / С.М. Навашин, И.П. Фомина. - Л.: Медицина, 1980. - 416 с.
21. Поздеев О.К. Медицинская микробиология, с. 351-357, М., Гэотар-мед, 2002.
22. Позднякова М.Г., Эсауленко Е.В., Го А. А, Атарская О.В., Амосова И.В., Попкова М.А., Ерофеева М.К. Возможность применения препарата «Полудан» в терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций//Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. - 2008.-№ 3 (28).-С. 95-99.
23. Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л. Очерки биохимической фармакологии. - Москва:РЦ «Фармединфо», 1996. - 384 с.
24. Сиротин А.А., Кролевец А.А., Трифонова М.Ф., Ключева В.В., Горлова А.А., Савинова Н.С. Наноструктурированные цефалоспориновые антибиотики: свойства и биологическая активность / А.А. Сиротин, А.А.

Кролевец, М.Ф. Трифонова, В.В. Ключева, А.А. Горлова, Н.С. Савинова // Известия МААО. - 2017. - №32. - С. 121-125.

25. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Андропова Т.М. Отечественные иммуностропные лекарственные средства последнего поколения и стратегия их применения. Фармакология 2002 г.
26. Харкевич Л.Л. Фармакология. — М.: ГЭОТЛР-Медиа. 2006. - 736 с.
27. Чекман И.С. Биохимическая фармакодинамика. - Киев: «Здоров», 1991. - 197 с.
28. Bentley R, Meganathan R (Sep 1982). «Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria». Microbiological Reviews 46 (3): 241-80. PMC 281544. PMID 6127606
29. Boehm T., Pirie-Shepherd S., Trinh L.B. et al.//Yeast. 1999. V.15. P.563-572.
30. D'Herelle F (1918). «Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire». Compt. Rend. Acad. Sci. 167: 970-972.
31. Dyer IE, Sankary TM, Dawson JA. Antibiotic resistance in bacterial urinary tract infections, 1991 to 1997. West J Med. 1998; 169:265-268.
32. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (Jun 2005). «Diversity of the human intestinal microbial flora». Science 308 (5728): 1635-8. Bibcode:2005Sci...308.1635E.
33. El-Shaboury S.R. Analysis of cephalosporin antibiotics/El-Shaboury S.R., Saleh G.A., Mohamed F.A., Rageh A.H.//J. Pharm. Biomed. Anal. -2007. -Vol. 45, №1. -P. 1-19.
34. Gupta K. Addressing Antibiotic Resistance Am J Med 2002; 113 (1A): 29S-34S
35. Gupta K. Emerging antibiotic resistance in urinary tract pathogens. Infect Dis Clin North Am. 2003; 17(2) :243-59.
36. Kauffmann, F. Zur Immunochemie O-Antigens von Enterobacteriaceae. b. vergleich der Zuckerbansteine von Polysacchariden aus Salmone-las S-und R-

formen/F. Kauffmann, L. Kruger, O. Luderitz//Zentr., Bakteriolog. Parasitenk. -
1961. -Abt. 1. Origin. -Bd. 182. -S. 57-66.

37. Kuttner A. G. (1923). «Bacteriophage phenomena». J. Bacteriol 8 (1): 49-101.
PMC 379003. PMID 16558985

38. Tatum E. L.; Lederberg J. (1947). «Gene recombination in the bacterium
Escherichia coli». J. Bacteriol 53: 673-684.