

© МОИСЕЕВ Д.В., 2014

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА УПАКОВКИ И ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ ХРАНЕНИЯ

МОИСЕЕВ Д.В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Проведено сравнение антимикробной активности девяти видов растительного сырья, содержащего фенольные соединения. Оценка проводилась методом диффузии в агар с использованием следующих штаммов микроорганизмов: *Escherichia coli* (ATCC 16404), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), а также дрожжевых грибов *Candida albicans* (ATCC 10231). В качестве референтных препаратов использовали растворы антимикробных лекарственных средств: гентамицин, ципрофлоксацин, цефотаксим и цефтриаксон в концентрациях от 0,5 до 32 мкг/мл. Установлена активность для четырех видов сырья (цветки лабазника вязолистного, листья бадана толстолистного, брусники обыкновенной и ольхи черной). Для сырья наблюдался четкий дозозависимый эффект. При длительном хранении в естественных условиях снижение антимикробной активности практически не наблюдается как для сырья в герметичной, так и в негерметичной упаковке. Увеличение влажности хранящегося сырья приводит к снижению антимикробной активности.

Ключевые слова: антимикробная активность, лабазник вязолистный, бадан толстолистный, брусника обыкновенная, ольха черная.

Abstract.

Antimicrobial activity of nine kinds of the herbal substances, containing phenolic compounds have been compared. The estimation has been made by the diffusion method to an agar with the use of the following microorganisms strains: *Escherichia coli* (ATCC 16404), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), and also yeast fungi *Candida albicans* (ATCC 10231). As reference preparations the solutions of antimicrobial medicinal remedies have been used, such as: gentamycin, ciprofloxacin, cefotaxime, and ceftriaxone in the concentrations from 0,5 to 32 mkg/ml. The activity for four kinds of medicinal plants (flowers of European meadowsweet, leaves of leather bergenia, leaves of cow-berry and leaves of black alder) has been determined. For herbal substances distinct dose dependent effect is observed. On long-term storage in natural conditions the decrease of antimicrobial activity is practically not observed, both for herbal substances in hermetic, and in non-hermetic package. The increase in humidity of the stored herbal substances leads to the decrease of antimicrobial activity.

Key words: antimicrobial activity, European meadowsweet, leather bergenia, cow-berry, black alder.

Любое лекарственное средство разрабатывается с учетом требований по эффективности, безопасности и качеству. В течение заявленного срока годности лекарственное средство должно удовлетворять всем требованиям регистрационного досье, в том числе и по показателям эффективности.

От синтетических лекарственных средств растительное сырье отличается тем, что в зависимости от упаковки деструкция биологиче-

ски активных веществ, по которым проводится стандартизация, в течение срока годности может достигать 50%. Для оценки влияния внешних факторов на стабильность синтетических фармацевтических субстанций и выработки решений по упаковке, в максимальной степени обеспечивающей сохранность, в настоящее время широко используются стресс-тесты (кислотный и щелочной гидролиз, нагревание, окисление, действие катионов железа и меди,

а также облучения). Для оценки стабильности лекарственных средств при хранении используются ускоренные испытания. Для стран Европейского региона они проводятся при температуре $40 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности $70 \pm 5\%$ в течение периода не менее 6 месяцев [1]. Методология проведения подобных испытаний и результаты оценки деструкции активных веществ для нескольких видов лекарственного растительного сырья были подробно рассмотрены в наших публикациях [2, 3]. В исследовании часть серии растительного сырья измельчали до размера крупного порошка (2000 мкм), другую часть оставляли целой. Сырье помещали в контейнеры как допускающие газообмен с внешней средой, так и герметично закупоренные. При этом в герметично закупоренных контейнерах создавали искусственную влажность (потерю в массе при высушивании) для сырья около 8-10% (кратковременно подсушивали сырье при температуре 85°C), около 11-13% (естественная влажность при воздушно-теновой сушке) и 25% (к навеске сырья с установленной влажностью добавляли рассчитанный объем воды до влажности 25%, перемешивали на вортекс-шейкере и сразу закупоривали). Хранение с периодическим переконтролем осуществляли в естественных условиях ($25 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение трех лет) и в термостатах при 40°C (274 дня) и 60°C (68 дней).

При определении сроков годности растительного сырья допускается снижение содержания активных веществ не более чем на 5% от исходного, а маркерных компонентов растительного сырья до 10% за весь период хранения [4, 5]. В герметичной упаковке относительное содержание фенольных соединений, по которым проводится стандартизация, за два года хранения (срок годности) в естественных условиях при пониженной влажности (около 9%) уменьшается на 5 – 10%, естественной (около 13%) на 10 – 30%, при повышенной влажности (около 25%) деструктируется до 70% веществ, в зависимости от вида сырья. В негерметичной упаковке за два года хранения исходное содержание БАВ снижается до 10% от исходного уровня для изучаемого сырья.

Данные о стабильности активных веществ в ЛРС, полученные в ходе ускоренных испытаний (40° и 60°C), коррелированы с данными, полученными при хранении ЛРС в естественных условиях. Скорость химических

реакций увеличивается в 2-3 раза при повышении температуры на каждые 10°C . Увеличение влажности сырья приводит к ускорению реакций деструкции активных компонентов. Установлено, что изменения содержания действующих веществ подчиняются общим закономерностям для каждого из изученных видов растительного сырья и кривые деструкции активных компонентов при 40°C находятся между кривыми деструкции для температур 25°C и 60°C . Поэтому было принято решение о сравнении антимикробной активности для граничных значений (растительное сырье, хранящееся в негерметичной упаковке и влажностью 9, 13 и 25% при 25°C в течение трех лет, в негерметичной упаковке и при влажности 25% при 60°C в течение 68 дней, в сравнении со свежепереработанным).

Целью настоящего исследования являлось сравнение антимикробной активности в растительном сырье при долгосрочных и ускоренных испытаниях для обоснования выбора первичной упаковки.

Методы

В исследованиях использовали растительное сырье, содержащее фенольные соединения: листья бадана толстолистного, листья брусники обыкновенной, трава зверобоя продырявленного, корневище горца татарского, цветки лабазника вязолистного, цветки девясилы высокого, цветки рудбекии шершавой, листья ольхи серой, листья ольхи черной. Растительное сырье заготавливалось в соответствии с рекомендациями ГАСР (Надлежащая практика сельскохозяйственного производства лекарственного растительного сырья) и отечественными рекомендациями [6]. Растительное сырье измельчали до размера крупного порошка (2000 мкм) и помещали в стеклянные контейнеры как допускающие газообмен с внешней средой, так и герметично закупоренные. При этом в герметично закупоренных контейнерах искусственно создавали влажность для сырья около 9%, 13% и 25%. Закладку на хранение осуществляли при температуре $25 \pm 5^\circ\text{C}$ и в термостате при 60°C . Экстракцию из растительного сырья проводили теми же растворителями, что и для количественного определения. Соотношение сырья и экстрагента составляло 1 к 50. Полученные экстракты

упаривали досуха и суспендировали полученные сухие остатки в таком же объеме воды для инъекций, как и для экстракции при помощи ультразвука.

Антимикробную активность суммы БАВ для трех видов растительного сырья до и после хранения в различных условиях исследовали на четырех видах микроорганизмов: грамотрицательные палочки факультативные анаэробы *Escherichia coli* (АТСС 16404) и аэробные *Pseudomonas aeruginosa* (АТСС 9027), аэробные грамположительные спорообразующие палочки *Bacillus subtilis* (АТСС 6633) и факультативно-анаэробные грамположительные кокки *Staphylococcus aureus* (АТСС 6538), а также дрожжевых грибов *Candida albicans* (АТСС 10231) производитель «Microbiologics» (США). Антибактериальную активность определяли с использованием метода диффузии в агар [7]. Для исследования применяли чистые культуры микроорганизмов, которые предварительно выращивали при температуре 37°C в течение 24 часов на скошенном мясопептонном агаре (МПА). Стандартную бактериальную суспензию готовили на стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида. Для этого бактериологической петлей вносили исследуемую культуру в стерильный флакон со стерильным физраствором и доводили концентрацию микроорганизмов до значения 0,5 единиц стандарта мутности по McFarland. Расплавленный и остуженный до 56°C МПА разливали в чашки Петри. На застывший агар с помощью автоматической пипетки в стерильных условиях в чашки Петри вносили по 1,0 мл соответствующей взвеси микроорганизмов. После равномерного распределения микроорганизмов по всей поверхности агара чашки инкубировали при комнатной температуре в течение 15-20 минут. Затем на чашке с микроорганизмами делали семь лунок диаметром 6,0 мм. Далее с помощью автоматической микропипетки в шесть лунок вносили по 20 μ л извлечений из растительного сырья в трех дозах, в одну лунку в качестве контроля вносили воду для инъекций, которую использовали для разведения проб. Пробы инкубировали при температуре при 37°C в течение 16 часов (микроорганизмы) и при 30°C для *Candida albicans* и оценивали рост микроорганизмов. Учет результатов проводили по наличию или отсутствию роста бактерий вокруг лунок с извлечением путем

измерения диаметра зоны вокруг лунки в миллиметрах.

Для сравнительной оценки антимикробной активности растительных экстрактов использовали водные растворы четырех антибиотиков: гентамицин сульфат, цефотаксим, цефтриаксон и ципрофлоксацин. Для приготовления использовали антибиотики следующих производителей: гентамицина сульфата 4% раствор (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», серия 170213), цефотаксим лиофилизированный порошок для инъекций 1,0 г (ОАО «БЗМП», серия 380512), цефтриаксон лиофилизированный порошок для инъекций 1,0 г (ОАО «БЗМП», серия 860812) и ципрофлоксацин капсулы 250 мг №20 (РУП «Белмедпрепараты», серия 111013). Из перечисленных антибиотиков готовили водные растворы концентрации 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 и 32 мг/мл методом последовательного разведения исходных растворов. Гентамицин – аминогликозид широкого спектра действия с высокой активностью против стафилококков, некоторых штаммов стрептококка, многих грамотрицательных микроорганизмов; ципрофлоксацин – фторхинолон с высокой активностью против большинства грамотрицательных микроорганизмов, стафилококка, микроорганизмов, продуцирующих бета-лактамазу. Цефотаксим и цефтриаксон – цефалоспорины III-го поколения, высокоактивны в отношении грамотрицательных микроорганизмов, цефтриаксон активен еще и в отношении грамположительных микроорганизмов [8].

Результаты и обсуждение

Экспериментально установлено, что растворы гентамицина и ципрофлоксацина проявляют высокую активность в отношении *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и среднюю активность в отношении изученного штамма *Pseudomonas aeruginosa*. Растворы цефтриаксона и цефотаксима активны в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, неактивны в отношении *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa* (табл. 1).

Полученные экспериментальные данные по ингибированию роста микроорганизмов представлены в таблицах 2-6. При интерпретации результатов условно приняли, что диаметр задержки роста микроорганизма свыше

Таблица 1 – Диаметр зон ингибирования роста различными антимикробными средствами (n=3)

С, мкг/мл	гентамицин				ципрофлоксацин				цефтриаксон				цефотаксим			
	B/s	E/c	P/a	S/a	B/s	E/c	P/a	S/a	B/s	E/c	P/a	S/a	B/s	E/c	P/a	S/a
32	18,5	16,5	12,5	17,5	28	24	24	30	11	24	-	21	-	26	-	27
16	17	15	9	15,5	27	21	21	27	6,5	21	-	21	-	24	-	25
8	15	12	6	14	23	18	16	26	-	20	-	18	-	21	-	23
4	13	11	-	12	18	13	13	24	-	17	-	17	-	19	-	21
2	8	7,5	-	8,5	16	10	12	21	-	17	-	16	-	18	-	18
1	6,1	6	-	6	13	6	7	18	-	16	-	12	-	17	-	14
0,5	6	-	-	-	7	-	-	14	-	14	-	8	-	14	-	11

Примечание: « - » – отсутствие активности.

Таблица 2 – Влияние растительных экстрактов на ингибирование роста *Bacillus subtilis* (n=3)

		Свеже- перера- ботанное	60°C открытое	60°C 25%	20°C открытое	20°C мин. влаж.	20°C сред. влаж.	20°C макс. влаж.
Бадан	Макс. доза	13,8	13,5	10	13,5	13,5	13,5	13
	Сред. доза	11	10,5	6,8	10,5	11	11	10
	Мин. доза	8	7,5	6,2	8	8	8	7,7
Брусника	Макс. доза	6,5	6,3	нет	6,4	6,5	6,5	нет
	Сред. доза	нет						
	Мин. доза	нет						
Лабазник	Макс. доза	14	13,5	10	13	13	13	10
	Сред. доза	11	11	7	11	11	11	7,5
	Мин. доза	9	8,5	6,5	8	8	8	7
Ольха черная	Макс. доза	9,5	9	7,3	6,8	6,8	6,8	6,4
	Сред. доза	7,5	7	6,5	6,5	6,2	6,2	6,1
	Мин. доза	6,5	6,3	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1

15 мм – высокая активность, 10-15 мм средняя активность, 6-10 мм низкая активность.

Как видно из таблицы 2, наиболее высокую антимикробную активность по отношению к *Bacillus subtilis* проявляют высокие и средние дозы цветков лабазника вязолистного и листьев бадана толстолистного (сопоставима с концентрациями гентамицина 2-16 мкг/мл и ципрофлоксацина 1-8 мкг/мл) для всех доз свежезаготовленного сырья. Снижение активности достоверно при хранении сырья с высокой влажностью (25%) как при 20°C, так и при 60°C. Листья ольхи черной проявляют низкую активность (в пересчете на гентамицин 0,5-2 мкг/мл и ципрофлоксацин 0,5 мкг/мл). Четко заметен дозозависимый эффект. Экстракты из листьев брусники обыкновенной, листьев ольхи серой, травы зверобоя продырявленного,

корневище горца татарского, цветков девясилы высокого, цветков рудбекии шершавой и корневище горца татарского не обладают активностью против *Bacillus subtilis* (табл. 3).

По отношению к штамму *Escherichia coli* средней активностью обладают экстракты из цветков лабазника в высоких и средних дозах и из листьев ольхи черной в высокой дозе, причем хранение при повышенной влажности достоверно снижает антимикробный эффект. Антимикробный эффект свежепереработанных цветков лабазника вязолистного сопоставим с действием гентамицина и ципрофлоксацина в концентрации от 1 до 8 мкг/мл, а листьев ольхи черной с концентрациями этих антимикробных средств в концентрациях до 2 мкг/мл. Остальные растительные экстракты активности против *Escherichia coli* не проявляли (табл. 4).

Таблица 3 – Влияние растительных экстрактов на замедление роста *Escherichia coli* (n=3)

		Свежепере- работанное	60°C открытое	60°C 25%	20°C открытое	20°C мин. влаж.	20°C сред. влаж.	20°C макс. влаж.
Лабазник	Макс. доза	13	12,8	9,3	13	13	13	9,3
	Сред. доза	11,5	11	7	11	11	11	8
	Мин. доза	9	8,5	7	9	9	9	7
Ольха черная	Макс. доза	9,3	9,3	8,2	7,4	7,3	7,3	7
	Сред. доза	8,5	8,5	7	6,3	6,3	6,3	6,1
	Мин. доза	6,2	6,2	нет	нет	нет	нет	нет

Таблица 4 – Влияние растительных экстрактов на замедление роста *Pseudomonas aeruginosa* (n=3)

		Свежепере- работанное	60°C открытое	60°C 25%	20°C открытое	20°C мин. влаж.	20°C сред. влаж.	20°C макс. влаж.
Бадан	Макс. доза	14,5	13,8	8	14	14	14	12,5
	Сред. доза	10	10	6,5	10	10	10	9,5
	Мин. доза	8	8	6,2	7,5	7,5	8	7
Брусника	Макс. доза	11	11	нет	10	10	10	9
	Сред. доза	10	10	нет	9	9	9	6,5
	Мин. доза	нет						
Лабазник	Макс. доза	19	18	13,5	18	18	18	13
	Сред. доза	14	13	11	13	13	13	11
	Мин. доза	10	10	9	10	10	10	9
Ольха черная	Макс. доза	9,3	9,3	7	7	7,5	7,5	6,2
	Сред. доза	7	6,8	6,5	6,2	6,1	6,1	6,1
	Мин. доза	6,2	6,2	нет	нет	6,1	нет	нет

Против *Pseudomonas aeruginosa* активны экстракты четырех растений (бадан, брусника, лабазник, ольха черная). Высокие дозы экстрактов из цветков лабазника высокоактивны против *Pseudomonas aeruginosa*, среднюю активность проявляют высокие дозы экстрактов из листьев бадана и брусники, а также средняя доза цветков лабазника. Повышение влажности сырья до 25% достоверно приводит к снижению антимикробной активности. Для всех растений наблюдается дозозависимый эффект (табл. 5).

Наиболее активны против *Staphylococcus aureus* экстракты из цветков лабазника и листьев бадана в высоких дозах. Листья ольхи черной и брусники проявляют низкую активность. Экстракты из остальных растений неактивны в отношении *Staphylococcus aureus* в изучаемых дозах (табл. 6).

Цветки лабазника, листья ольхи черной и бадана даже в высоких дозах практически не проявляют активности против *Candida albicans*.

Заключение

Антимикробную активность против изученных штаммов микроорганизмов проявляли экстракты из четырех растений (цветки лабазника вязолистного, листья бадана толстолистно, брусники обыкновенной и ольхи черной). Для сырья наблюдался четкий дозозависимый антимикробный эффект. Доказано, что при длительном хранении в естественных условиях снижение антимикробной активности практически не наблюдается как для сырья в герметичной, так и в негерметичной упаковке. Снижение антимикробной актив-

Таблица 5 – Влияние растительных экстрактов на замедление роста *Staphylococcus aureus* (n=3)

		Свежепере- работанное	60°C открытое	60°C 25%	20°C открытое	20°C мин. влаж.	20°C сред. влаж.	20°C макс. влаж.
Бадан	Макс. доза	13	13	8,5	13	13	13	13
	Сред. доза	11	11	7	11	11	11	10
	Мин. доза	10	9,5	6,5	9	9	9	8,5
Брусника	Макс. доза	6,5	6,5	нет	6,5	6,5	6,5	6,2
	Сред. доза	6,2	6,2	нет	6,2	6,2	6,2	нет
	мин доза	нет						
Лабазник	Макс. доза	13,8	13	8,3	13	13	13	9
	Сред. доза	11	11	7	10,5	11	11	7,5
	Мин. доза	9	9	6,5	7,5	8	8	7
Ольха черная	Макс. доза	9,8	9,5	8,3	7,3	8	7,8	6,9
	Сред. доза	7	7	6,3	6,1	6,2	6,2	нет
	Мин. доза	6,5	6,4	нет				

Таблица 6 – Влияние растительных экстрактов на замедление роста *Candida albicans*

		свежее	60°C открытое	60°C 25%	20°C открытое	20°C мин. влаж.	20°C сред. влаж.	20°C макс. влаж.
Бадан	Макс. доза	10	11	6,5	11,5	10,5	10,5	10
	Сред. доза	8	8	6,2	10	8	8	8
	Мин. доза	6,3	6,3	6,1	6,3	6,3	6,3	6,2
Лабазник	Макс. доза	10	11	6,1	7	7	8	6,2
	Сред. доза	7	6,5	нет	6,5	7	6,3	нет
	Мин. доза	6,3	6,5	нет	6,2	нет	6,2	нет
Ольха черная	Макс. доза	6,2	6,1	6	6,2	6,1	6,1	нет
	Сред. доза	6,1	6,1	нет	нет	нет	нет	нет
	Мин. доза	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет

ности возможно происходит из-за снижения количества фенольных соединений, которые гидролизуются при хранении растительного сырья при повышенной влажности. Поэтому при промышленном производстве с целью максимальной защиты действующих веществ от деструкции и сохранения антимикробной активности при первичной переработке необходима сушка сырья до влажности около 10% и применение герметичной упаковки.

Для остального сырья – травы зверобоя продырявленного, корневища горца татарского, цветков девясила высокого, цветков рудбекии шершавой, листьев ольхи серой – активность против изучаемых штаммов для всех изученных доз не установлена.

Автор выражает благодарность всем сотрудникам кафедры клинической микробиологии УО «ВГМУ» за оказанную поддержку при проведении исследований.

Литература

1. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products [Electronic resource] // WHO Technical Report Series. – 2009. – N 953. – Mode of access: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19133en/s19133en.pdf>.
2. Моисеев, Д. В. Новый метод определения сроков годности лекарственного растительного сырья (листья *Rhaponticum Carthamoides*) на основе стресс-теста «ускоренное старение» / Д.

- В. Моисеев // Рецепт. – 2012. – № 2. – С. 47–54.
3. Моисеев, Д. В. Кинетика реакции деструкции арбутина в листьях брусники обыкновенной при хранении в естественных и стрессовых условиях / Д. В. Моисеев // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2013. – № 2. – С. 106–111.
 4. ТКП 451-2012 (02041), ВУ. Производство лекарственных средств. Требования к качеству лекарственных средств растительного происхождения = Вытворчасць лекавых сродкаў. Патрабаванні да якасці лекавых сродкаў расліннага паходжання. – Введ. 01.03.13. – Минск : Департамент фармацевтической промышленности, [2013]. – 19 с.
 5. ТКП 454-2012 (02041), ВУ. Производство лекарственных средств. Спецификации: методы испытаний и критерии приемлемости для лекарственного растительного сырья, продуктов из лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения = Вытворчасць лекавых сродкаў. Спецыфікацыі: метады выпрабаванняў і крытэрыі прыёмальнасці для лекавай расліннай сыравіны, прадуктаў з лекавай расліннай сыравіны і лекавых сродкаў расліннага паходжання. – Введ. 01.03.13. – Минск : Департамент фармацевтической промышленности, [2013]. – 17 с.
 6. ТКП 450-2012 (02041), ВУ. Производство лекарственных средств. Надлежащая практика выращивания, сбора, хранения лекарственного растительного сырья = Вытворчасць лекавых сродкаў. Належная практыка вырошчвання, збору, захоўвання лекавай расліннай сыравіны. – Введ. 01.03.13. – Минск : Департамент фармацевтической промышленности, [2013]. – 14 с.
 7. Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 2 т. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / Центр экспертиз и испытания в здравоохранении ; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно : Победа, 2012. – 1220 с.
 8. Реестр лекарственных средств Республики Беларусь [Электронный ресурс] // Реестры УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» : [сайт]. – Режим доступа: www.rceth.by/Refbank/reestr_lekarstvennih_sredstv/. – Дата доступа: 29.09.2014.

Поступила 30.09.2014 г.

Принята в печать 05.12.2014 г.

Сведения об авторах:

Моисеев Д.В. – к.ф.н., доцент, заведующий кафедрой стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК. Тел.моб.: +375 (29) 710-24-38, e-mail: www.ussr80@yandex.ru – Моисеев Дмитрий Владимирович.