

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 57



7-8'2012

Научно-практический журнал

ЕСЛИ ТРЕБУЕТСЯ ЭМПИРИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ГРАМ (+) ИНФЕКЦИЙ...

КУБИЦИН
даптомицин

MSSA
ПУТЬ ВВЕДЕНИЯ
S. AUREUS
ВЫСОКИЙ
РИСК
S. EPIDERMIDIS
MRSA

- ▶ MRSA — инфекция почти вдвое повышает риск летального исхода⁹
- ▶ Отсроченная терапия бактериемии, увеличивает летальность и длительность госпитализации¹⁰
- ▶ «...большинство экспертов готовы предпочесть бактерицидный препарат бактериостатическому при сепсисе/бактериемии...»¹¹
- ▶ «...бактерицидная терапия обеспечивает лучший результат за счет более быстрой гибели бактерий...»¹¹

- ▶ Быстрый бактерицидный эффект в отношении широкого спектра грамположительных бактерий^{1,2}
- ▶ Действует как на MRSA, так и на MSSA^{3,4}
- ▶ Действует быстрее стандартной терапии⁵
- ▶ Хорошо проникает в биопленки и вегетации^{5,6}
- ▶ Хорошо переносится⁸
- ▶ Применяется один раз в день⁸

КУБИЦИН / CUBICIN® КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Регистрационное удостоверение: № ЛСР-005067/09

Лекарственная форма. Даптомицин. Лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 350 мг, 500 мг. Показания. Осложненные инфекции кожи и мягких тканей у взрослых, бактериемия, вызванная *Staphylococcus aureus*, включая установленный или предполагаемый инфекционный эндокардит у взрослых. Противопоказания. Гиперчувствительность к даптомицину или вспомогательным веществам. Способ применения и дозы. Кубицин вводится внутривенно струйно в течение как минимум 2 минут, путем внутривенной инфузии в течение как минимум 30 минут. Длительность инфузии кожи и мягких тканей. Рекомендованная доза для взрослых — 4 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7-14 дней или до исчезновения инфекции. Бактериемия, вызванная *Staphylococcus aureus*, включая установленный или предполагаемый инфекционный эндокардит. Рекомендованная доза для взрослых — 6 мг/кг 1 раз в сутки в течение 2-6 недель по усмотрению лечащего врача. У пациентов с клиренсом креатинина < 30 мл/мин или больных, получающих гемодиализ или непрерывный амбулаторный перитонеальный диализ, интервал между введениями Кубицина должен быть увеличен до 48 часов. Препарат Кубицин следует вводить сразу после выполнения процедуры гемодиализа. Поскольку эффективность и безопасность Кубицина у детей и подростков не установлена, препарат не рекомендуется применять у данной категории больных. С осторожностью. На фоне применения препарата отмечалось развитие анафилактических реакций и реакций гиперчувствительности. Пациенты с выявленными дисками, принимающие препарат Кубицин, требуют повышенного внимания из-за риска развития *Clostridium difficile* инфекции. В случае подозрения/подтверждения диареи, вызванной *Clostridium difficile*, лечение следует прекратить и при необходимости назначить соответствующую терапию. Если на фоне применения препарата Кубицин наблюдаются ухудшение течения или рецидивирование бактериемии/эндокардита, вызванных *Staphylococcus aureus*, или отмечается низкая клиническая эффективность препарата, следует провести повторное выделение возбудителя из крови пациента. Может потребоваться соответствующее хирургическое вмешательство или назначение другого антибактериального препарата. У пациентов, получающих лечение препаратом Кубицин, возможно развитие резистентности к препарату. При развитии антибиотикорезистентности к даптомицину необходимо принять соответствующие меры. Возможно ошибочное повышение показателя отношения протромбинового времени/международного нормализованного отношения (ПТ/МНО). При применении препарата Кубицин отмечались случаи поражения мышц (включая рабдомиолиз). Активность креатинин-фосфокиназы (КФК) плазмы крови необходимо определять до начала терапии и во время лечения препаратом Кубицин у всех пациентов, при назначении препарата вместе с ингибиторами ТМГ-КоА-редуктазы (определение КФК следует проводить чаще). При развитии симптомов миопатии и повышении активности КФК более чем 1000 МЕ/л или при повышении активности КФК более чем 2000 МЕ/л (108 U/l) при отсутствии симптомов миопатии лечение препаратом следует прекратить. На фоне применения препарата повышался риск развития зоонозной пневмонии. При развитии проявлений зоонозной пневмонии на фоне применения препарата Кубицин, необходимо незамедлительно отменить лечение, назначить обследование и соответствующую терапию, включая глюкокортикостероиды. Возможна отмена терапии ингибиторами ТМГ-КоА-редуктазы при совместном назначении с препаратом Кубицин. Необходимо с осторожностью назначать Кубицин пациентам с нарушениями функции почек (КФК < 30 мл/мин), скарлатина, тяжелыми нарушениями функции печени (> 9 баллов по шкале Child-Pugh), а также больным старше 65 лет. Назначать препарат при беременности следует только в тех случаях, когда ожидаемая польза для матери превышает потенциальный риск для плода. На время применения препарата грудное вскармливание следует прекратить. Следует с осторожностью применять Кубицин вместе с потенциально нефротоксичными препаратами, обеспечить дополнительный регулярный контроль функции почек у всех больных (независимо от исходного состояния функции почек). Несовместимость. Нельзя смешивать Кубицин с глюкозосодержащими растворами, а также другими лекарственными средствами, за исключением вышеуказанных. Побочные эффекты. Часто (>1-10%): грибовидная инфекция (включая кандидоз), инфекция мочевыводящих путей; анемия; тремор; боковая головная боль; головокружение; снижение или повышение артериального давления (АД); боль в животе, запор, тошнота, рвота, диарея, вздутие и болезненное напряжение живота; сыпь, зуд; боль в конечностях; реакции в месте введения препарата; повышение температуры тела; астения; повышение активности КФК; нарушения лабораторных показателей функции печени (повышение активности аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ)). Нечасто (>0.1-1%): грибовидный сепсис; тромбоцитоз; зоонозная пневмония; снижение аппетита; гипергликемия; нарушение электролитного баланса; парестезия; мускульные нарушения; тремор; вертиго; суправентрикулярная экзистика; «приливы» крови к лицу; диспепсия; крапивница; мышечная боль; мышечная слабость; диарея; нарушения функции почек, включая почечную недостаточность; вагинит; повышенная утомляемость; озноб; повышение активности лактатдегидрогеназы крови; повышение концентрации креатинина в плазме крови; увеличение МНО. Редко (<0.01-0.1%): желтуха; увеличение протромбинового времени. Данные постмаркетинговых наблюдений: реакции гиперчувствительности, включая зоонозные инфекции, инфицированные в легких, антигеновоточный отек, лекарственную сыпь с зоонозными и системными симптомами - DRESS-синдром и анафилактический шок; рабдомиолиз; периферическая нейропатия; диарея, вызванная *Clostridium difficile*; кашель, вирусно-буллезная сыпь; обострение системных заболеваний; зоонозная пневмония; повышение концентрации миоглобина в крови и моче. Применение для врачей. Прежде, чем назначить препарат, пожалуйста, прочтите также инструкцию по медицинскому применению.

НОВАРТИС ФАРМА АГ, ШВЕДЦИЯ, ПРОИЗВЕДЕНО НОВАРТИС ФАРМАСЮТИКАЛЗ ЮК ЛТД, ВЕЛИКОБРИТАНИЯ.

MRSA — метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*.
MSSA — метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*.
ИКМТ — инфекции кожи и мягких тканей.

* Ванкомицин/полусинтетические пенициллины.

ЛИТЕРАТУРА: 1. Rybak MJ et al. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against staphylococci and enterococci, including vancomycin-intermediate and -resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:1062-6. 2. Tedesco KL and Rybak MJ. Daptomycin. *Pharmacotherapy*. 2004;24:41-57. 3. Arbeit RD et al. The safety and efficacy of daptomycin for the treatment of complicated skin and skin-structure infections. *Clin Infect Dis*. 2004;38:1673-81. 4. Fowler VG et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*. 2006;355:653-65. 5. Chalfani A-M et al. Efficacy and safety of daptomycin in the treatment of Gram-positive catheter-related bloodstream infections in cancer patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Aug;36(2):182-6. Epub 2010 May 8. 6. Raad I et al. Comparative Activities of daptomycin, linezolid and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremia* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob agents chemother* 2007;51:1656-1660. 7. Marco F. et al. Daptomycin is effective in treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant and glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jul; 52 (7): 2538-43. 8. Инструкция по медицинскому применению препарата Кубицин. 9. Whitby M. et al. Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *MJA* 2001; 175: 264-267. 10. Lodise TP et al. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin. Infect Dis* 2003;36:1418-1423. 11. I.M. Gould. MRSA bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30S (2007) S66-S70.

NOVARTIS

ООО «Новartis Фарма»
115035, г. Москва, ул. Садовническая, 82/2.
Тел. (495) 967-12-70; Факс (495) 967-12-68
www.novartis.ru

КУБИЦИН
даптомицин

Простое решение для терапии
грамположительных инфекций

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

«Antibiotics and Chemotherapy»
Published 12 times a year
Founded in 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

Подписка по каталогу Роспечать:

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

*Подписка через объединенный каталог
«Пресса России»:*

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

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

Установочный тираж 5000 экз.
© ГНЦА 2012

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 57

7—8'2012

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

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

Зам. главного редактора — к. м. н. Буданов С. В.
Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Член-корр РАМН, проф., д. м. н. Белоусов Ю. Б.
Проф., д. м. н. Белобородов В. А.
Проф. Говорун В. М.
Проф. Гомберг М. А.
Д. б. н. Даниленко В. Н.
Проф. Климко Н. Н.
Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.
Проф., д. м. н. Никитин А. В.
Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.
Проф. Руднов В. А.
Проф. Тишков В. Н.
Проф., д. б. н. Фирсов А. А.
Проф., д. м. н. Яковлев В. П.
Проф., д. м. н. Яковлев С. В.
Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы
к.м.н. Кузнецова С. М.
к.б.н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.	Клясова Г. А.
Бибикова М. В.	Ленёва И. А.
Васильев А. Н.	Митрохин С. Д.
Волжанин В. М.	Романцов М. Г.
Дмитриева Н. В.	Сычев Д. А.
Долгова Г. В.	Тец В. В.
Захарова Ю. А.	Цыбанев А. А.
Зуева Л. П.	Ших Е. В.
Ильина Е. Н.	

**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

Бибикова М. В., Грамматикова Н. Э., Спиридонова И. А.,
Даниленко А. Н., Катлинский А. В.
Штамм *Streptomyces* sp. 17 — продуцент олигомицина SC-II
(характеристика продуцента, биологические свойства
антибиотика)
Автономова А. В., Баканов А. В., Шуктеева М. И.,
Винокуров В. А., Попова О. В., Усов А. И.,
Краснопольская Л. М.
Погружённое культивирование и химический состав
мицелия *Hericium erinaceus*
Романцов М. Г., Галимзянов Х. М., Локтева О. М.,
Коваленко А. Л., Степанов А. В.
Экспериментальная и клиничко-лабораторная оценка
эффективности комплексной терапии арбовирусных
заболеваний

В помощь практикующему врачу

Аверьянов А. В., Бабкин А. П., Барт Б. Я., Волчецкий А. Л.,
Минина Е. С., Козырев О. А., Костинов М. П., Петров Д. В.,
Селькова Е. П., Путиловский М. А., Нечаев В. Б.,
Эпштейн О. И., Андрианова Е. Н.
Эргоферон и Осельтамивир в лечении гриппа —
результаты многоцентрового сравнительного
рандомизированного клинического исследования
Шевырева Е. В., Иванов А. К., Суханов Д. С., Мурзина А. А.
Гепатопротекторная терапия ремаксолом у больных
туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией в дневном стационаре
противотуберкулёзного диспансера
Уткин Е. В., Подонина Н. М., Кордубайлова Н. И.
Роль и место антибактериальной терапии в профилактике
нарушений репродуктивной функции у женщин

Обзоры

Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н.
Биологически активные нерибосомальные пептиды.
III. Механизм биосинтеза нерибосомальных пептидов

По страницам журналов

Юбилей

Научно-технологической фармацевтической компании
«ПОЛИСАН» — 20 лет

Original Papers

- 3** Bibikova M. V., Grammatikova N. E., Spiridonova I. A.,
Danilenko A. N., Kamlinsky A. V.
Streptomyces sp. 17, an Organism Producing Oligomycin SC-II
(Culture Characteristics and Antibiotic Biological Properties)
- 7** Avtonomova A. V., Bakanov A. V., Shuktueva M. I.,
Vinokurov V. A., Popova O. V., Usov A. I.,
Krasnopolskaya L. M.
Submerged Cultivation and Chemical Composition
of *Hericium erinaceus* Mycelium
- 12** Romatsov M. G., Galimzyanov Kh. M., Lokteva O. M.,
Kovalenko A. L., Stepanov A. V.
Experimental and Clinicolaboratory Evaluation
of Complex Therapy Efficacy in Arboviral Infections

Guidelines for Practitioners

- 23** Averyanov A. V., Babkin A. P., Bart B. Ya., Volchetsky A. L.,
Minina E. S., Kozyrev O. A., Kostinov M. P., Petrov D. V.,
Selkova E. P., Putilovsky M. A., Nechaev V. B.,
Epstein O. I., Andrianova E. N.
Ergoferon and Oseltamivir in Treatment of Influenza:
Results of Multicentre Randomized Comparative Clinical Trial
- 31** Shevyreva E. V., Ivanov A. K., Sukhanov D. S., Murzina A. A.
Remaxol Hepatoprotective Therapy of Patients
with Tuberculosis and HIV Infection in Day Unit
of Tuberculosis Dispensary
- 38** Utkin E. V., Podonina N. M., Kordubailova N. I.
Role and Place of Antibacterial Therapy in Prophylaxis
of Disturbances in Reproductive Function of Women

Reviews

- 43** Orlova T. I., Bulgakova V. G., Polin A. N.
Biologically Active Nonribosomal Peptides.
III. Mechanism of Biosynthesis of Nonribosomal Peptides

Abstracts

Anniversary

Twenty-Year Anniversary of Scientific Technological
Pharmaceutical Firm POLYSAN

* 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.

Штамм *Streptomyces* sp. 17 — продуцент олигомицина SC-II (характеристика продуцента, биологические свойства антибиотика)

М. В. БИБИКОВА¹, Н. Э. ГРАММАТИКОВА², И. А. СПИРИДОНОВА¹, А. Н. ДАНИЛЕНКО³, А. В. КАТЛИНСКИЙ⁴

¹ ООО «Виорин», Москва

² ООО «Олфарм», Москва

³ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

⁴ НПО «Микроген» МЗ РФ

Streptomyces sp. 17, an Organism Producing Oligomycin SC-II (Culture Characteristics and Antibiotic Biological Properties)

M. V. BIBIKOVA, N. E. GRAMMATIKOVA, I. A. SPIRIDONOVA, A. N. DANILENKO, A. V. KATLINSKY

Viorin, Moscow

Olfarm, Moscow

N. M. Emmanuel Research Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow

Microgen, Moscow

При скрининга продуцентов антибиотиков с гиполипидемической и антигрибной активностями был отобран штамм *Streptomyces* sp. 17. Исследованы таксономически значимые характеристики штамма. Нароботан комплексный препарат, из которого методами колоночной хроматографии и ВЭЖХ выделены активные соединения — олигомицин А и олигомицин SC-II. Установлено, что олигомицин А проявляет более высокую антигрибную активность, а олигомицин SC-II проявляет также умеренную антибактериальную активность.

Ключевые слова: скрининг, актиномицет, таксономия, антибиотическая активность, гиполипидемическая активность.

Under the screening programme for organisms producing substances with hypolipidemic and antifungal activity *Streptomyces* sp. 17 was isolated. The taxonomic properties of the strain were investigated. Active compounds, i.e. oligomycin A and oligomycin SC-II were isolated from a complex biosynthetic product. Oligomycin A showed high antifungal activity whereas oligomycin SC-II had also moderate antibacterial activity.

Key words: screening, actinomycete, taxonomy, antibiotic activity, hypolipidemic activity.

Комплекс макролидных антибиотиков олигомицинов А, В, С и отдельно его компоненты широко используются в исследовательских работах в качестве высокоспецифичных ингибиторов активности F₀F₁-АТФазы [1, 2]. Установлена высокая противоопухолевая и антигрибная активность этих антибиотиков, однако высокая токсичность ограничивает их использование в клинике. Попытки найти менее токсичные новые аналоги этих антибиотиков продолжаются. Описаны близкие по структуре и механизму действия антибиотики апоптолидин, оссамицин, цитоварицин, олигомицины D-G, рутамицин В, которые широко исследуются на наборе из 40 клеточных опухолевых линий человека в Национальном

институте Здоровья США [3–6]. Проводятся исследования по получению химических модификаций олигомицин А в ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» РАМН [7].

В процессе поиска соединений, проявляющих гиполипидемическую и иммуносупрессивную активность, нами был выделен новый продуцент комплекса олигомицинов, одним из компонентов которого является олигомицин SC-II, описанный ранее в качестве соединения, продуцируемого грамотрицательной бактерией *Pantoea agglomerans* SCRCJ-SA 120 [8].

В статье приводится таксономическая характеристика продуцента *Streptomyces virginiae* 17, условия ферментации и выделения олигомицина SC-II.

Материал и методы

Штамм *Streptomyces* sp. 17 был выделен из почвенного образца Тувы. При изучении систематического положения продуцента использовали определители [9, 10].

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. За. ООО «Виорин»

Таблица 1. Макроморфологические характеристики культуры *Streptomyces* sp. 17 при росте на агаризованных средах

Среда	Диаметр и форма колоний	Воздушный мицелий	Субстратный мицелий	Растворимый пигмент, цвет
Минеральный агар Гаузе №1	d колонии 3—5 мм, круглые выпуклые, слегка складчатые (+)	Сиренево-серый, скудный Н7А5	Тёмный почерневший А2 Д1	Отсутствует
Органический Гаузе №2	d колонии 1—2 мм (+)	Отсутствует	Жёлто-коричневый П2	Отсутствует
Глицерин-нитратная	d колонии 3—5 мм, плоские центр приподнят (++)	Бело-серый А4-Д3	Тёмно-каштановый О7	Отсутствует
Крахмально-аммиачная	d колонии 5—6 мм, край в виде валика с плоскими кольцами (+)	Пепельный К2	Тёмно-серый до черного А2-А1	Отсутствует
Среда Красильникова (Ср1)	d колонии 1 мм, неправильной формы с плотным центром (+)	Пепельный К2	Пепельный К-2	Отсутствует
Среда Чапека	d колонии 5—6 мм, плоские с центрическим кольцами (+)	Отсутствует	Дымчатый Л1	Отсутствует
Мясо-пептонный агар	d колонии 2—2,5 мм, круглые, плоские (+)	Отсутствует	Желтоватый П3	Бежеваторозовый О5
Солодовый агар	d колонии 4—6 мм, сильно приподнятые, аспорогенные, складчатые, край фестончатый (++)	Отсутствует	Тёмно-каштановый О7	Отсутствует
Овсяный агар (ISP 3)	d колонии 5—7 мм, выпуклые с экссудатом (++)	Серо-сиреневый Н7 А5	Серо-белый А6-Д3	Отсутствует
Глицерин-аспарагиновый агар (ISP 5)	d колонии 2—4 мм, выпуклые, складчатые, центр провален, край фестончатый (+)	Отсутствует	Красно-коричневый Л5	Красно-коричневый Л5

Примечание. «+» — рост удовлетворительный; «++» — рост хороший; «+++» — рост очень хороший.

Для оценки культурально-морфологических признаков культуру выращивали при 28°C на агаризованных средах: минеральный агар Гаузе 1, среда Гаузе 2, глицерин-нитратная среда, крахмально-аммиачная среда (ISP 4), среда Чапека с глюкозой, мясо-пептонная среда, солодовый агар, овсяной агар (ISP 3), глицерин-аспарагиновая среда (ISP 5), ISP 2. Учитывали диаметр (d) колонии, цвет и форму воздушного мицелия (ВМ), цвет субстратного мицелия (СМ), наличие растворимого пигмента (РП) на 7-е и 14-е сутки роста.

Определение диаминопимелиновой кислоты в гидролизатах целых клеток изучаемого штамма определяли методом восходящей тонкослойной хроматографии в целлюлозном геле [11].

Физиолого-биохимическая характеристику штамма оценивали по: использованию источников углерода, добавленных в среду Предгейма и Готлиба (ISP 9). Образование меланоидных пигментов определяли при росте на пептонно-дрожжевом агаре с железом (ISP 6) и тирозиновом агаре (ISP 7). Оценивали способность к коагуляции и пептонизации молока, способность разжижать желатину.

Микроморфологические исследования штамма осуществляли микроскопированием окрашенных метиленовой синью мазков при увеличении в 40—900 раз с использованием микроскопа МБИ-15У4.2. Споры и вид спороносов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (микроскоп AMRAY (США)) при увеличении до 30000 раз (совместно с проф. О.В. Комзолькиной).

Биосинтез антибиотического комплекса. Штамм-продуцент выращивали на агаризованной среде Гаузе 1 в течение 10—14 сут при 28°C. Хранили при +4°C не более 2 месяцев. Биосинтез проводили в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл, заполненных 100 мл питательной среды М-1 [12] в течение 6 сут. при 28°C на качалках с режимом перемешивания 4 с⁻¹.

Образование антибиотического комплекса оценивали по активности ацетоновых экстрактов из мицелия продуцента в отношении *Aspergillus niger* 137а и по интенсивности пятен, полученных методом ТСХ на пластинках Silufol (Чехия) в системах бензол—ацетон (2:1); этилацетат—изопропанол (95:5). Пластинки проявляли в парах иода и биопроявлением, с использованием в качестве тест-организма

Aspergillus niger 137а. Активности фракций на пластинке оценивали по диаметрам зон подавления роста тест-организма.

Выделение антибиотиков. По окончании биосинтеза биомассу отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 минут. Нативный раствор отбрасывали. Антибиотический комплекс извлекали из мицелия ацетоном — 3 объёма растворителя на 1 объём биомассы. Экстракт концентрировали на вакуумно-ротаторном испарителе (ИР-1) до остатка в виде масла. К масляному концентрату прибавляли избыток петролейного эфира и выдерживали в холодильнике до осаждения препарата. Выпавший аморфный осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре и высушивали в вакуум-сушильном шкафу. Полученный антибиотический комплекс был разделен с помощью препаративной ВЭЖХ. Хроматографическая колонка — Zorbax C18 (4,6×250,5 мкм), элюент: метанол — вода (85:15), скорость элюции — 0,7 мл/мин, детектирование — УФ-детектор при длине волны 225 нм, объём вводимой пробы 20 мкл при концентрации вещества 300 мкг/мл. В качестве стандарта использовали комплекс олигомицинов фирмы SIGMA, содержащий 60% олигомицина А, 30% олигомицина В и 10% олигомицина С.

Определение антибиотической активности. Антибиотическую активность определяли методом диффузии в агар в отношении тест-микроорганизмов: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* 24, *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 209Р, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus niger* 137, *Tolypocladium inflatum* BKM 2223, *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata* 645, *Trichoderma alba* F-32.

Результаты и обсуждение

Таксономическая характеристика штамма. На твёрдых питательных средах культура образует плотные колонии с диаметром от 1 до 7 мм, на большинстве исследованных сред со скудным воздушным мицелием. Форма колоний и вид воздушного мицелия зависели от среды культивирования (табл. 1).

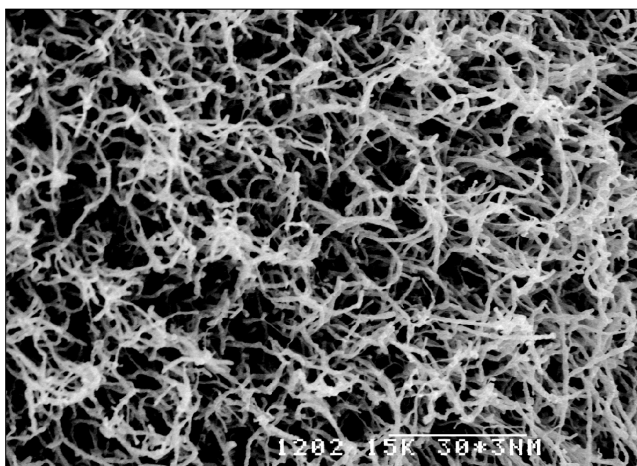


Рис. 1. Электронная микроскопия воздушного мицелия штамма 17.

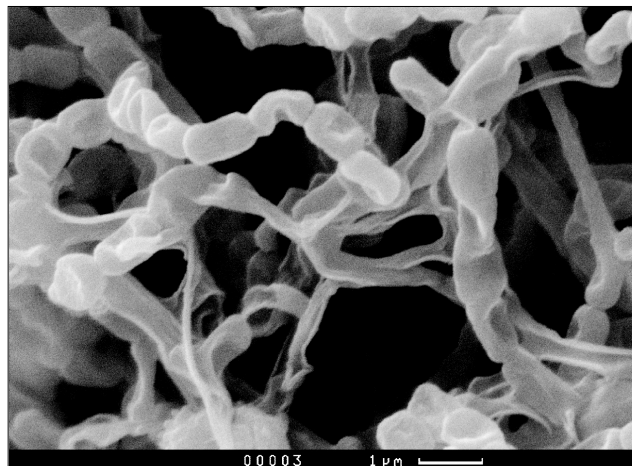


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия спор культуры 17.

Таблица 2. Физико-химические свойства олигомицинов А и SC-II, продуцируемые штаммом *Streptomyces* sp. 17

Показатель	Олигомицин А	Олигомицин SC-II
Внешний вид	Порошок белого цвета	Порошок белого цвета
УФ-спектр в метаноле, нм	218, 225, 232, 242	218, 225, 232, 242
Молекулярная масса	791 (МН+)	778 (МН+)
ТСХ на пластинках Silufol в системах:		
бензол—ацетон (5:1)	$R_f=0,45$	$R_f=0,50$
гексан—ацетон (2:1)	$R_f=0,34$	$R_f=0,36$

Микроморфологические свойства штамма. При исследовании световой микроскопией наблюдали разветвлённый субстратный мицелий и воздушный мицелий, на котором формируются спораносцы в виде крючков (RA, RF) (рис. 1). Спорангии, склеротии, подвижные споры отсутствуют. Гидролизат целых клеток штамма содержал только LL-диаминопимелиновую кислоту.

Сканирующая электронная микроскопия выявила гладкие, овальные споры размером 1,10—1,25 микрон (рис. 2)

Основываясь на полученных результатах штамм 17 был отнесен к роду *Streptomyces*.

Физиологические свойства культуры. Рассматриваемый штамм является аэробом, оптимальная температура для роста 26—28°C. Молоко пептонирует, желатину слабо разжижает, крахмал гидролизует крайне слабо, меланоидные пигменты образует на тирозиновом агаре (ISP7), пептонирует и коагулирует молоко.

На среде Предгейма и Готлиба штамм *Streptomyces* sp. 17 умеренно растет только в присутствии D-мальтозы и L-арабинозы, остальные углеводы практически не гидролизуются культурой.

Исходя из полученных данных штамм *Streptomyces* sp. 17 наиболее близок к *S.lavendulae* и *S.virginiae*. Уточнение видовой принадлежности было проведено анализом 16S рибосомальной РНК. Данные будут представлены в отдельном сообщении.

Биосинтез и выделение антибиотического комплекса. Суммарный комплекс олигомицинов нарабатывали в колбах на качалках. Комплекс олигомицинов извлекали из мицелия. Оценку компонентного состава полученного комплекса олигомицинов проводили на пластинках Кизельгель. Очистку отдельных компонентов комплекса проводили колоночной хроматографией с последующей очисткой методом ВЭЖХ. Было установлено, что комплекс олигомицинов состоит из компонентов А, SC-II в соотношении 90:10. С помощью полупрепаративного ВЭЖХ были получены и охарактеризованы чистые компоненты. В табл. 2 представлены физико-химические свойства компонентов антибиотического комплекса олигомицинов А и SC-II.

Биологическая активность олигомицинов А и SC-II. В табл. 3 представлен спектр антибиотической активности исследуемых олигомицинов, свидетельствующий о высокой активности соединений в отношении мицелиальных грибов, при этом олигомицин А имеет более широкий спектр действия. Олигомицин SC-II, в отличие от олигомицина А, проявляет умеренную активность в отношении бактериальных культур.

Нами было изучено влияние комплексного препарата, выделенного из мицелия штамма *Streptomyces* sp. 17, на уровень общего холестерина и липопротеидов высокой плотности в сыворотке крови кроликов с эксперименталь-

Таблица 3. Антибиотическая активность олигомицинов А и SC-II

Тест-микроорганизм	Олигомицин А	Олигомицин SC-II
<i>Aspergillus niger</i> 137 a	0,5	0,5
<i>Aspergillus fumigatus</i> 132a	1,5	
<i>Tolypocladium inflatum</i>	1	
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	
<i>Curvularia lunata</i> 645	0,5	
<i>Trichoderma alba</i> F-32	0,5	х
<i>Penicillium brevicompactum</i> 234		>100
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	10	—
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 663	—	>50
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>micrococcus luteus</i> 537	—	>50
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> HB	—	>50
<i>Bacillus pumilis</i> NCTC 8241	—	>50
<i>Bacillus subtilis</i> var J12	—	>50
<i>Escherichia coli</i> 25922	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	—	—

Таблица 4. Влияние препарата № 17 и ловастатина на уровень ОХ и ЛПВП в сыворотке крови кроликов

Препарат	Концентрация препарата, мг/кг	Максимальное снижение уровня общего холестерина, %	Максимальное увеличение уровня ЛПВП, %
Ловастатин	4	53,50	17,77
Препарат № 17	0,04	38,6	26,43

ной гиперхолестеринемией [13]. Было установлено, что в концентрации в 100 раз более низкой, чем субстанция ловастатина, комплексный препарат 17 проявлял выраженный гиполипидемический эффект. Результаты представлены в табл. 4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith R. M. Oligomycin, a new antifungal antibiotic. *Antibiot Chemother* 1954; 4: 962.
2. Бибилова М. В., Грамматикова Н. Э. и др. Механизм биологической активности макролидных антибиотиков — ингибиторов F0F1-ATFase. *Антибиотики и химиотер* 2003; 6: 25—32.
3. Nakakita Y., Nakagawa M., Sakai H. Isolation of oligomycin A as a result of screening for antagonists of lipids. *J Antibiot* 1980; 33: 514—516.
4. Yamazaki M., Yamashita T., Harada T. et al. 44-Homooligomycins A and B, new antitumor antibiotics from *Streptomyces bottropensis*. Producing organism, fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. *J Antibiot* 1992; 45: 171—179.
5. Дриняев В. А., Кругляк Е. Б., Аппинянская Л. М. и др. *Streptomyces avermytilis* — продуцент олигомицина. *Биотехнология* 1994; 7: 30—35
6. Enomoto Y., Shiomi K., Matsumoto A. et al. Isolation of a new antibiotic oligomycin G produced by *Streptomyces* sp. WK-6150. *J Antibiot* 2001; 54: 3: 308—313.

Заключение

В процессе поиска микроорганизмов — продуцентов антибиотиков с гиполипидемической и антигрибной активностью был выделен штамм *Streptomyces* sp. 17, продуцирующий комплекс макролидных антибиотиков олигомицин А и олигомицин SC-II.

7. Тренин А. С. Поиск микробных метаболитов — ингибиторов биосинтеза стеролов и противогрибковых антибиотиков. Автореф. дис. д.б.н., 2012.
8. Реферат заявки Японии JP.09 208587 (опубл. 12.08.1997)
9. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешикова М. А. и др. Определятель актиномицетов. М.: 1983.
10. Actinomycete taxonomy / ed. Dietz A, Thayer D.W. The Upjohn Company «All Rights Reserved». 1980.
11. Hasegawa T., Takisawa M., Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen. Appl. Microbiol* 1983; 29: 1319—1322.
12. Бибилова М. В., Селехова Г. Н., Востров С. Н., Фишман А. А. Оптимизация состава ферментационной среды для выделения продуцентов антибиотиков из микромонопор. *Антибиотики* 1981; 12: 899—904
13. Чмель Я. В., Бибилова М. В. и др. Скрининг природных соединений с гиполипидемической активностью. *Антибиотики и химиотер* 2004; 8—9: 8—12.

Погружённое культивирование и химический состав мицелия *Hericium erinaceus*

А. В. АВТОНОМОВА¹, А. В. БАКАНОВ¹, М. И. ШУКТУЕВА¹, В. А. ВИНОКУРОВ²,
О. В. ПОПОВА², А. И. УСОВ³, Л. М. КРАСНОПОЛЬСКАЯ¹

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

² Российский государственный университет нефти и газа им. И. М. Губкина, Москва

³ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Submerged Cultivation and Chemical Composition of *Hericium erinaceus* Mycelium

A. V. AVTONOMOVA, A. V. BAKANOV, M. I. SHUKTUEVA, V. A. VINOKUROV,
O. V. POPOVA, A. I. USOV, L. M. KRASNOPOLSKAYA

G. F. Gauze Research Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

I. M. Gubkin Russian State University of Petroleum and Gas, Moscow

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

На основе изучения трофических потребностей лекарственного гриба *Hericium erinaceus* и оптимизации одной из наиболее перспективных жидких питательных сред разработан способ погружённого культивирования, обеспечивающий получение 22–23 г/л воздушно-сухой биомассы на 7-е сутки ферментации. Способ погружённого культивирования масштабирован для условий лабораторного ферментёра. Изучен химический состав мицелия *H. erinaceus*, полученного по разработанному способу. По содержанию всех незаменимых аминокислот за исключением триптофана биомасса *H. erinaceus* соответствовала требованиям ФАО/ВОЗ. Основными жирными кислотами мицелия *H. erinaceus* являются олеиновая и линолевая. Содержание водорастворимых полисахаридов составляет 19%. Выделены две фракции водорастворимых полисахаридов, содержащие в своём составе рамнозу, фукозу, ксилозу, глюкозу и галактозу. В погружённой биомассе *H. erinaceus* обнаружены витамины B₁, B₂, B₆, PP и E, эргостерин, коэнзим Q.

Ключевые слова: погружённое культивирование, мицелий *Hericium erinaceus*.

Submerged cultivation of *Hericium erinaceus* in various media was studied. The yield of the biomass was shown to depend mainly on the carbon source, whereas the content of water soluble polysaccharides depended mainly on the nitrogen source. The optimal medium composition provided the biomass yield of 21–23 g/l in 7 days. The biomass was characterized by the content of total protein, lipids and carbohydrates. In addition, the amino acid composition of the biomass was determined and shown to meet all the requirements of FAO/WHO concerning the amounts of essential amino acids (with exception of tryptophane). Oleinic and linoleic acids were identified as the main components of the fatty acids. Two water soluble polysaccharide fractions differing in solubility in aqueous ethanol were isolated and shown to contain rhamnose, fucose, xylose, glucose and galactose in different proportions. Vitamins B₁, B₂, B₆, PP and E, ergosterol and coenzyme Q were also detected in the biomass of *H. erinaceus*.

Key words: submerged cultivation, *Hericium erinaceus*.

Введение

Поиск, изучение и технологии получения из природных объектов новых субстанций для лекарственных препаратов являются важными направлениями современных исследований в областях медицины и биотехнологии. Базидиальные грибы, обладающие широкими биосинтетическими возможностями, относятся к наиболее перспективным в этом отношении объектам. Один из них — ксилотрофный гриб *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. — гериций решетчатовидный,

львиная грива, ямабушитакэ. Обладая удивительным вкусом и формой, этот гриб содержит биологически активные вещества, способные оказывать положительное воздействие на человеческий организм. За последние два десятилетия у *H. erinaceus* были обнаружены метаболиты, способные стимулировать образование нейротрофинов, в том числе фактора роста нервов (NGF) и нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки, проявлять гиполипидемические и иммуномодулирующие свойства. В последнее время для получения биологически активных соединений *H. erinaceus* разрабатывают способы выращивания не только плодовых тел, но и погру-

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, Б.Пироговская, 11, строение 1. НИИНА

жённного мицелия гриба. Из культуральной жидкости *H.erinaceus* была изолирована полисахаридная фракция, обладающая противоопухолевым и иммуномодулирующим эффектом и содержащая в своём составе преимущественно глюкозу [1]. Эринацин, обладающий стимулирующим действием на синтез фактора роста нервов, был выделен из мицелия *H.erinaceus*, выращенного в погружённой культуре [2]. Позднее способ получения эринацина был оптимизирован, максимальное содержание эринацина А составило 192 ± 42 мг/л культуральной жидкости, длительность процесса культивирования — 8 суток [3]. Эндополисахариды *H.erinaceus*, выращенного в погружённой культуре, обладают антиоксидантными и гепатопротекторными свойствами [4], оказывают противоопухолевое действие [5, 6]. В литературе описаны способы погружённого культивирования *H.erinaceus*, эффективность накопления погружённой биомассы в которых существенно варьирует: 2,7–9,2 г/л [7], $14 \pm 0,45$ г/л [8], 19,92 г/л [9].

Данная статья посвящена разработке метода выращивания *Hericium erinaceus* в погружённой культуре и определению химического состава полученного мицелия.

Материал и методы

В работе использовали штамм *H.erinaceus* из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений ФГБУ «НИИНА» РАМН.

Погружённое культивирование осуществляли в колбах вместимостью 0,5 и 0,75 л на ротационной качалке при 220 об/мин и в лабораторном биореакторе (15 л, фирма New Brunswick) при аэрации стерильным воздухом 1,0 об/об·мин с механическим перемешиванием ($n=200$) мешалкой лопастного типа. Температура культивирования составляла $26-28^\circ\text{C}$. Среда стерилизовали при 1,2 атм. 30 мин. Среда содержала минеральные соли и органические источники углерода и азота, такие как глюкоза, сахароза, растительное масло, меласса, соевая мука, амарантовая мука, кукурузный экстракт, дрожжевой экстракт. Длительность процесса культивирования составляла от 4 до 11 суток. В процессе культивирования изменяли накопление биомассы (весовым методом после высушивания) и pH культурального фильтрата (потенциометрически). Опыты ставили в двух повторностях. По завершении процесса культивирования мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием, промывали дистиллированной водой и сушили до постоянного веса при температуре, не превышающей 45°C . Содержание влаги в воздушно-сухом образце составляло 6,5%.

Для приготовления водных экстрактов навеску сухого мицелия заливали дистиллированной водой и автоклавировали 2 ч при 1,2 атм. а затем полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр и хранили при -20°C .

Определение количественного содержания полисахаридов в водных экстрактах мицелия проводили с использованием фенол-сернокислотного метода [5].

Полисахаридные фракции (I и II) водного экстракта погружённого мицелия *H.erinaceus* получали последовательным осаждением полимеров путём добавления в экстракт 96% этанола. Полисахаридная фракция I была получена после добавления к водному экстракту двух равных объёмов этанола. Оса-

док отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин. Для получения полисахаридной фракции II к супернатанту добавляли ещё два объёма этанола и центрифугировали в том же режиме. После осаждения осадки лиофилизировали. Для определения моносахаридного состава полисахариды подвергали полному гидролизу обработкой 2М трифторуксусной кислотой в присутствии в качестве маркера миоинозита. Полученные моносахариды переводили в ацетаты полиолов, которые идентифицировали и количественно определяли с применением газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) на хроматографе HP 5890A [6].

Липиды выделяли по методу Фолча [7] из сухой биомассы. Содержание липидов в мицелии определяли весовым методом. Для определения состава жирных кислот выделенный липидный остаток обрабатывали по ГОСТ Р 51486-99 с целью получения метиловых эфиров жирных кислот и далее исследовали хроматографически согласно ГОСТ Р 51483-99. Газо-жидкостная хроматография проведена на хроматографе AI Cambridge GC 95M с пламенно-ионизационным детектором (капиллярная колонка SP-2340 $30 \text{ м} \times 0,25 \text{ мм} \times 0,2 \text{ мкм/толщина жидкого слоя}$). Для калибровки системы использован стандартный образец метиловых эфиров рапсового масла фирмы Supelco (Cat No. 07756-1AMP).

Определение содержания общего белка в биомассе проводили по методу определения азота по Кьельдалю с последующим пересчётом на белок [9]. Используемый коэффициент пересчёта — 4,38. Определение аминокислотного состава проводили после гидролиза образцов с помощью аминокислотного анализатора Биотроник LC-7000 [9].

Метод определения витаминов А, Е основан на экстракции витаминов и введении экстракта на ВЭЖХ колонку для хроматографического разделения и последующего определения с помощью флуоресцентного («Джаско» 821-FP) и спектрофотометрического («Джаско» 870-UV) детекторов. Использована ВЭЖХ система HP 1050. Определение витаминов В₁, В₂ и В₆ проводили методом ВЭЖХ в обращённофазовом ион-парном варианте в изократическом режиме со спектрофлуориметрическим детектированием (интервал длин волн 220-650 нм) [9]. Содержание эргостерина оценивали методом ГЖХ, анализируя стерины, выделенные из липидов путём тонкослойной хроматографии фракции неомыляемых веществ [9]. Определение коэнзима Q проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе с УФ-детектором в соответствии с рекомендациями Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России [9].

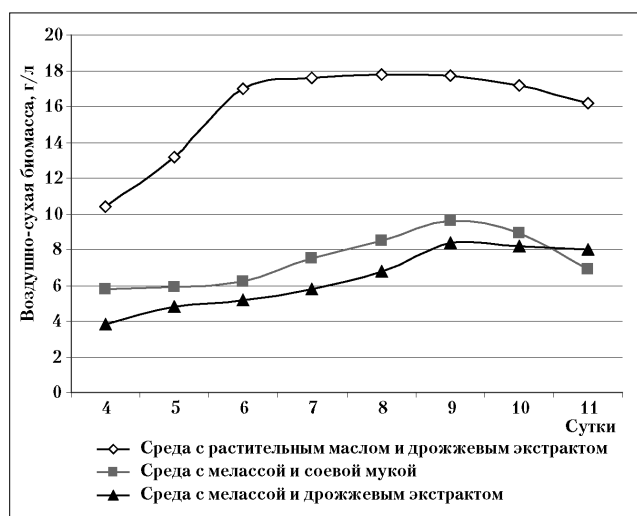
Содержание изучаемых веществ пересчитывали на абсолютно сухую биомассу.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования было оценено влияние различных сочетаний источников углерода и азота на накопление биомассы использованного штамма *H.erinaceus* и содержание в ней водорастворимых полисахаридов, обладающих противоопухолевым действием [5, 6]. Полученные результаты приведены в табл. 1 и на рисунке. *H.erinaceus* на всех средах рос в виде округлых рыхлых пеллет. По обеспечению выхода воздушно-сухой биомассы все среды можно было разбить на две группы. На средах первой группы накопление биомассы варьировало в пределах 8,1–11,0 г/л. В состав этой группы входили все среды с растительным маслом и мелассой, за исключением среды, содержащей мелассу в сочета-

Таблица 1. Накопление воздушно-сухой биомассы и водорастворимых полисахаридов мицелия на средах с различными источниками питания

Источник углерода	Источник азота	Выход воздушно-сухой биомассы, г/л	Водорастворимые полисахариды	
			содержание в абсолютно сухом мицелии, %	выход, г/л
Сахароза	Соевая мука	5,4	37,4	1,89
	Дрожжевой экстракт	4,0	18,2	0,68
	Амарантовая мука	3,6	20,3	0,68
	Кукурузный экстракт	4,5	13,9	0,58
Растительное масло	Соевая мука	9,2	19,8	1,75
	Дрожжевой экстракт	11,0	23,5	2,42
	Амарантовая мука	8,1	24,6	1,86
	Кукурузный экстракт	9,3	10,7	0,93
Меласса	Соевая мука	9,9	19,3	1,78
	Дрожжевой экстракт	9,8	28,9	2,65
	Амарантовая мука	8,9	21,4	1,78
	Кукурузный экстракт	5,8	12,8	0,70



Накопление воздушно-сухой биомассы *H.erinaceus* на неоптимизированных средах с различными источниками углерода и азота.

нии с кукурузным экстрактом. Среда второй группы обеспечивали выход биомассы в пределах 3,6—5,8 г/л. Эту группу менее эффективных сред составили все среды с сахарозой и среда с мелассой и кукурузным экстрактом. Таким образом, выход биомассы *H.erinaceus* в большей степени зависел от источника углерода, чем от источника азота. Содержание водорастворимых полисахаридов в погружённом мицелии, выращенном на разных средах, варьировало в широких пределах 10—35% и зависело, прежде всего, от источника азота в среде. Наиболее низкое содержание водорастворимых полисахаридов было отмечено в мицелии, полученном на всех средах с кукурузным экстрактом. Среда с сахарозой и соевой мукой обеспечивала самое высокое содержание водорастворимых полисахаридов в мицелии. По выходу водорастворимых полисахаридов в расчёте на литр среды изученные композиции сред были разделены на три группы. Наибольший выход водорастворимых полисахаридов, составивший

2,42—2,65 г/л, был отмечен на средах с дрожжевым экстрактом, за исключением среды с сочетанием дрожжевого экстракта и сахарозы. Выход водорастворимых полисахаридов в диапазоне 1,75—1,89 г/л, обеспечивали все среды с соевой мукой и амарантовой мукой в сочетании с растительным маслом и мелассой. Остальные среды были малоэффективны для получения водорастворимых полисахаридов, выход которых составил 0,58—0,93 г/л.

Максимальное накопление биомассы *H.erinaceus* на всех изученных средах приходилось на 8—9-е сутки культивирования. На среде с растительным маслом и дрожжевым экстрактом максимум содержания биомассы был отмечен на 8-е сутки. Активное накопление погружённого мицелия на этой среде заканчивалось к 6-м суткам, за последующие двое суток выход воздушно-сухой биомассы возрастал только на 1 г/л (рисунок). Содержание водорастворимых полисахаридов в мицелии снижалось к 6-м суткам процесса и далее оставалось практически без изменений. Снижение было достаточно резким. Так, за двое суток (с 4 по 6) доля водорастворимых полисахаридов в мицелии уменьшилась примерно на 10%. Несмотря на снижение содержания водорастворимых полисахаридов в мицелии, их выход в течение процесса погружённого культивирования постоянно возрастал до 8-х суток за счёт увеличения накопления биомассы.

На следующем этапе работы была проведена оптимизация состава жидкой питательной среды для погружённого культивирования *H.erinaceus*. Задача этого этапа исследования заключалась в достижении выхода воздушно-сухой биомассы гриба не менее 20 г/л. В качестве источников углерода и азота были выбраны растительное масло и соевая мука, т. к. дорогостоящий дрожжевой экстракт в неоптимизированных количествах по сравнению с соевой мукой увеличивал выход биомассы только на 2 г/л. Работу проводили по ранее предложенному алгоритму создания биотехноло-

Таблица 2. Потребность взрослого человека в незаменимых аминокислотах (НА) согласно рекомендации ФАО/ВОЗ (Food and Agriculture Organization & World Health Organization, 1990) и содержание НА в мицелии *H.erinaceus* (г / 100 г белка)

Аминокислота	Необходимый уровень НА	Оптимальный уровень НА. Эталон ФАО/ВОЗ	Содержание в мицелии <i>H.erinaceus</i>
Изолейцин	1,80	2,80	3,42
Лейцин	2,50	6,60	7,49
Лизин	2,20	5,80	4,28
Метионин + цистин	2,40	2,50	3,21
Фенилаланин + тирозин	2,50	6,30	14,55
Треонин	1,30	3,40	5,13
Триптофан	0,65	1,10	—
Валин	1,80	3,50	4,39

Таблица 3. Состав нейтральных моносахаридов во фракциях водорастворимых полисахаридов погружённого мицелия *H.erinaceus*

Фракция	Содержание моносахарида, %				
	рамноза	фукоза	ксилоза	глюкоза	галактоза
I	1,8	4,3	2,8	30,6	3,8
II	2,0	4,4	1,2	21,8	11,2

гических способов погруженного культивирования мицелиальных грибов [11]. Поставленная задача была решена, благодаря постановке экспериментов с использованием методов математического планирования. Были использованы такие методы, как метод полного факторного эксперимента (ПФЭ) и метод крутого восхождения (КВ). В двухуровневом ПФЭ было изучено влияние четырех факторов (соль магния, дигидрофосфат калия, растительное масло и соевая мука) на накопление биомассы *H.erinaceus*. Согласно полученным в ПФЭ результатам значимыми факторами для накопления биомассы *H.erinaceus* были дигидрофосфат калия, растительное масло и соевая мука. Результаты ПФЭ были использованы для постановки опыта по методу КВ, в котором на протяжении семи шагов одновременно меняли концентрации всех значимых факторов в соответствии с величиной и знаком их коэффициентов регрессии. Результатом этой части работы стал способ погруженного культивирования *H.erinaceus*, обеспечивающий получение 22—23 г/л воздушно-сухой биомассы на 7-е сутки ферментации.

Разработанный способ погруженного культивирования был масштабирован для условий лабораторного биореактора. Выход биомассы *H.erinaceus* варьировал в диапазоне 21—23 г/л, выход водорастворимых полисахаридов от 4,2 до 4,6 г/л. Полученные экспериментальные партии погруженного мицелия *H.erinaceus* были использованы для дальнейших химических и медико-биологических исследований.

Общее содержание жиров в погруженной биомассе *H.erinaceus* составило 15,5%. Суммарное содержание аминокислот составило 20,1%. Для сравнения был использован метод определения общего белка по Кьельдалю, заключающийся в

определении азота в образце и использовании коэффициента 4,38. Расчётное содержание белка по этому методу составило 19,1%.

Изучение аминокислотного состава показало, что в процентном отношении от общего количества аминокислот больше всего в погруженной биомассе содержалось глутаминовой кислоты (20,2%), а также аспарагиновой кислоты (10,4%) и тирозина (9,8%). Содержание незаменимых кислот лейцина, треонина, фенилаланина, лизина, валина, изолейцина и метионина в целом было выше или совпадало с содержанием этих аминокислот в стандартном белке ФАО/ВОЗ (табл. 2). Исключение составило содержание лизина, которое было немного ниже оптимального.

Содержание водорастворимых полисахаридов в мицелии, выращенном на разработанной среде, составило 19,6%. Из водного экстракта погруженного мицелия осаждением этанолом были получены две фракции полисахаридов I и II, различающиеся по растворимости в водном этаноле, и изучен их моносахаридный состав. По данным ГЖХ, обе полисахаридные фракции содержали в своём составе рамнозу, фукозу, ксилозу, глюкозу и галактозу, количественные соотношения которых в этих фракциях были различны (табл. 3). Основным моносахаридом обеих групп была глюкоза.

При определении состава и содержания жирных кислот было показано, что погруженная биомасса *H.erinaceus* содержала такие жирные кислоты, как олеиновая, линолевая, пальмитиновая, стеариновая, линоленовая, арахидовая (эйкозановая), эруковая. Из общего количества жирных кислот на ненасыщенные приходилось немногим более 80%. Больше всего во фракции жирных кислот содержалось олеиновой кислоты (59%). На втором месте была линолевая кислота (21%).

В экспериментальном образце погружённой биомассы *H.erinaceus* было изучено наличие жи-ро- и водорастворимых витаминов и эргостерина. Витамины А и D в биомассе обнаружены не были. Содержание эргостерина в биомассе составило 0,64%. Из изученных витаминов больше всего в биомассе *H.erinaceus* содержалось витамина РР — 152 мг/100 г. Количество витамина В₁ составило 2,2 мг/100 г биомассы, В₂ — 3,6 мг/100 г, В₆ — 3,6 мг/100 г. Витамин Е содержался в мицелии в количестве 30 мг/100 г.

В биомассе *H.erinaceus* был обнаружен коэнзим Q10 в количестве 5,3 мг/100 г мицелия.

Заключение

Таким образом, было оценено влияние источников питания на накопление в погружённой культуре биомассы *H.erinaceus* и содержание в ней водорастворимых полисахаридов, что позволило выбрать одно из наиболее эффективных сочетаний источников углерода и азота. Оптимизация жидкой питательной среды позволила

разработать способ погружённого культивирования *H.erinaceus*, обеспечивающий получение 21—23 г/л воздушно-сухой биомассы на 7 сутки ферментации. Способ погружённого культивирования масштабирован для условий лабораторного ферментёра. Изучен химический состав мицелия *H.erinaceus*, полученного по разработанному способу. Оценено общее количество белков, жиров и углеводов, изучен аминокислотный состав, жирнокислотный состав, содержание витаминов группы В и витамина Е, эргостерина и коэнзима Q. Полученные результаты свидетельствуют о том, что погружённая биомасса *H.erinaceus* может служить источником промышленного получения биологически активных соединений для биомедицины и биофармацевтики.

Работа частично выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 годы» при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang J. C. Hu S. H., Lee T. M. Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericium* spp. Kaoshing J Med Sci 2001; 17: 9: 461—467.
2. Shimbo M., Kawagishi H., Yokogoshi H. Erinacine A increases catecholamine and nerve growth factor content in the central nervous system of rats. Nutrition Research 2005; 25: 6: 617—623.
3. Krzyczkowski W., Malinowska E., Herold F. Erinacine A biosynthesis in submerged cultivation of *Hericium erinaceum*: quantification and improved cultivation. Engineering in Life Sciences 2010; 10: I: 5: 446—457.
4. Zhanga Z., Lva G., Pana H., Pandeyb A., Hec W. Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey. I.J.Biologocal Macromolecules 2012; 51: I: 5: 1140—1146.
5. Краснополянская Л. М., Белицкий И. В., Автономова А. В., Соболева Н. Ю., Усов А. И., Исакова Е. Б., Либензон А. В., Бухман В. М. Система скрининга экстрактов базидиальных грибов, обладающих противоопухолевой активностью. Успехи медицинской микологии. Материалы III Всерос. конгр. по медицинской микологии. М.: 2005; 5: 192—195.
6. Автономова А. В., Леонтьева М. И., Исакова Е. Б., Баканов А. В., Усов А. И., Бухман В. М., Краснополянская Л. М. Изучение противоопухолевых свойств мицелия *Hericium erinaceus*, полученного в условиях погруженного культивирования. В сб.: Биотехнология и биомедицинская инженерия (Труды 3 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Курск, 7—8 июня 2010 г.). Курск, 2010; 5—8.
7. Lomberh M. L., Solomko E. F., Buchalo A. S., Kirchhoff B. Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures. Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the 4th International Conference. Mexico, 2002; 367—377.
8. Malinowska E., Krzyczkowski W., Lapienis G., Herold F. J Industr Microbiol Biotech 2009; 36: 12: 1513—1527.
9. Cui F., Liu Z., Li Y., Ping L., Zhang Z., Lin L., Dong Y., Huang D. Production of mycelial biomass and exo-polymer by *Hericium erinaceus* CZ-2: Optimization of nutrient levels using response surface methodology. Biotech Bioprocess Engineering 2010; 15: 2: 299—307.
10. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 1956; 28: 3: 350—356.
11. Слонекер Дж. Методы исследования углеводов / Под ред. А. Я. Хорлина. М.: 1975; 22—25.
12. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue (for brain, liver and muscle). J Biol Chem 1957; 226: 497—509.
13. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р 4.1.1672-03. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004; 240.

Экспериментальная и клинично-лабораторная оценка эффективности комплексной терапии арбовирусных заболеваний

М. Г. РОМАНЦОВ¹, Х. М. ГАЛИМЗЯНОВ², О. М. ЛОКТЕВА³, А. Л. КОВАЛЕНКО⁴, А. В. СТЕПАНОВ⁵

¹ ГОУ ВПО «Северо-Западный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург

² ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», Астрахань

³ ООО «Научно-технологическая фармацевтическая фирма «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

⁴ ФГБУН Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург

⁵ Филиал Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова — «Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, Санкт-Петербург

Experimental and Clinicolaboratory Evaluation of Complex Therapy Efficacy in Arboviral Infections

M. G. ROMATSOV, KH. M. GALIMZYANOV, O. M. LOKTEVA, A. L. KOVALENKO, A. V. STEPANOV

I. I. Mechnikov North-Western Medical University, St. Petersburg

Astrakhan State Medical Academy, Astrakhan

POLYSAN Co, St. Petersburg

Institute of Toxicology, St. Petersburg

Research Experimental Institute of Military Medicine, St. Petersburg

Актуальность поиска лекарственных средств, эффективных при профилактике и лечении опасных инфекционных заболеваний (особенно арбовирусных инфекций), достаточно высока, поскольку отсутствует специфическая терапия. Многолетние исследования индукторов интерферона показали наличие иммуномодулирующего, противовирусного, противовоспалительного эффекта и низкую токсичность этих соединений. В данном исследовании, показано, что степень выраженности протективного эффекта распределяется следующим образом: при венесуэльском энцефаломиелите лошадей (ВЭЛ) — циклоферон > амиксин = ридостин; при лихорадке долины Рифт (ЛДР) — циклоферон > амиксин > ридостин; при оспе хищных (ОХ) — циклоферон > амиксин = ридостин, свидетельствуя о наибольшей эффективности циклоферона при ВЭЛ, ЛДР и ОХ, что позволяет считать его приоритетным в качестве средства профилактики и терапии опасных вирусных инфекций (ОВИ). Рибавирин, в комбинации с раствором циклоферона и циклоферон в таблетированной форме сокращают длительность лихорадки, минимизируют синдром интоксикации, способствуют более раннему разрешению геморрагической сыпи, снижают частоту осложнений, улучшая прогноз заболевания.

Ключевые слова: опасные инфекционные заболевания, лихорадка долины Рифт, лихорадка Денге, индукторы интерферона, химиопрепараты, крымская геморрагическая лихорадка, циклоферон, реамберин.

Search for drugs efficient in prophylaxis and treatment of dangerous infections (especially arboviral ones) is rather actual, since no specific therapy is available. Many-year investigations of interferon inducers showed that they had immunomodulating, antiviral and antiinflammatory effects and were low toxic. The present study demonstrated that the protective effect was the following: Venezuelan equine encephalitis (VEE) — cycloferon > amixin = ridostin, Rift Valley fever (RVF) — cycloferon > amixin > ridostin, predator pox (PP) — cycloferon > amixin = ridostin, that was obvious that cycloferon was the most active agent in the treatment of VEE, RVF and PP, thus making it possible to acknowledge its priority in prophylaxis and therapy of dangerous viral infections (DVI). Ribavirin in combination with cycloferon solution or cycloferon tablets provided shorter periods of the fever, minimized the intoxication syndrome, promoted earlier resolution of hemorrhagic eruption and lowered the frequency of complications, which was in favour of the disease prognosis.

Key words: dangerous infections, Rift Valley fever, dengue fever, interferon inducers, chemopharmaceuticals, Crimean hemorrhagic fever, cycloferon, reamberin.

Введение

Начало XXI века «ознаменовалось» вспышками инфекционных заболеваний. Выявлено около 35 новых и возродившихся старых инфекций,

представляющих угрозу населению мира. Особое значение имеют арбовирусные болезни (АБ) (arthropod borne viruses вирусы), переносимые членистоногими (лихорадка Чикунгунья, жёлтая лихорадка, лихорадка Денге, омская геморрагическая лихорадка, лихорадка долины Рифт, крымская геморрагическая лихорадка) [1–10]. Инфекции вызывают поражение центральной

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41. Северо-Западный медицинский университет им. И. И. Мечникова

нервной системы и лихорадочные заболевания, которые необходимо включать в дифференциальную диагностику, поскольку резервуаром для арбовирусов служат птицы, грызуны и комары. Новому подъёму заболеваемости способствуют усиленное размножение комаров в водоёмах, расположенных вблизи жилья, скученность городского населения, авиаперелёты, повышающие риск прибытия лиц в инкубационном периоде арбовирусных инфекций, проявлением которых являются лихорадка, сыпь, полиартрит, гепатит, менингоэнцефалит, геморрагическая лихорадка [11].

Геморрагические лихорадки — полиэтиологичная группа острых вирусных зоонозных инфекций, объединённых по признаку развития геморрагического синдрома на фоне острого лихорадочного состояния и характеризующихся интоксикацией, поражением сосудов с развитием тромбогеморрагического синдрома [12].

Возбудители геморрагических лихорадок — РНК-содержащие вирусы, принадлежащие к четырём семействам, содержащим РНК, покрытые липидсодержащей оболочкой [13]. Большинство РНК-содержащих вирусов кодируют белки сигнальной системы альфа-интерферона, среди них идентифицированы NS-белки (инактивирующие транскрипционный фактор NF- κ B, обрывая процесс инициации транскрипции генов интерферона) лихорадки долины Рифт. Основной мишенью для патогенных вирусов является протеинкиназа (PKR), обеспечивающая контроль внутриклеточных сигналов активации транскрипции генов интерферона, а совместно с NS1 — контроль за развитием противовирусной защиты [14].

Геморрагические лихорадки (лихорадка Денге, крымская геморрагическая лихорадка, жёлтая лихорадка, лихорадка долины Рифт) имеют сходные признаки: длительность инкубационного периода включает от 1 до 3 недель. Лихорадкам присуще острое, внезапное начало с ознобом, гипертермией, слабостью, нарастающей интоксикацией. Температура обычно резко повышается и вскоре снижается по типу кризиса или ускоренного лизиса. В начальный период нередко бывает головная боль, усиливающаяся в разгар болезни на уровне высокой температуры и стихающая по мере её снижения. Из других жалоб начального периода можно отметить общую разбитость, боль в мышцах и животе, потерю аппетита, тошноту и рвоту, сухость во рту, жажду. Жалобы многообразны, динамичны, изменчивы на протяжении не только дня, но и нескольких часов. Они отражают цикличность болезни, закономерную смену отдельных симптомов.

Характерно заметное покраснение лица. Гиперемия распространяется на шею и верхнюю часть туловища. Веки слегка набухают, от этого лицо приобретает некоторую одутловатость. От-

чётливо выражена инъекция сосудов склер. Зев гиперемирован, отмечается энантема мягкого нёба. Положительный симптом шипка, кровоизлияния на местах инъекций говорят о повышенной ломкости сосудов. Одним из типичных проявлений является геморрагический синдром: петехиальная сыпь, носовое, гастродуоденальное и маточное кровотечения.

В процессе развития болезни отчётливо проявляются типичные симптомы и признаки, позволяющие разграничить геморрагические лихорадки по этиологическому признаку. Например, при лихорадке Денге особенно сильно поражаются и крайне болезненны коленные суставы, мышцы и сухожилия нижних конечностей. Вследствие сильного затруднения подвижности изменяется и становится своеобразной походка («походка денди»). Крупные суставы обычно не изменены, мелкие иногда припухают.

Типичны жалобы, связанные с расстройством зрения. Больные жалуются, что у них словно сетка перед глазами, туман, рябит в глазах, предметы сливаются вдаль, что можно объяснить парезом аккомодации. Возникающая вначале лейкопения сменяется лейкоцитозом, повышается СОЭ, возрастает активность аминотрансфераз, повышается уровень остаточного азота в крови.

Широкий спектр возбудителей, вызывающих единый по клинике комплекс симптомов, обусловлен однотипным механизмом его формирования. Из данных морфологического и иммуногистологического изучения вышеуказанных заболеваний известно, что основная патология развёртывается в эндотелиальных клетках микроциркуляторной системы, клетках костного мозга и для некоторых инфекций (лихорадка Марбург, Денге) в процесс вовлекаются мононуклеарные фагоциты, как циркулирующие в русле крови, так и тканевые. Это находит отражение в клеточном, белковом и пептидном составе крови и балансе её биологически активных компонентов. Затрагивается деятельность систем комплемента, кининовой, коагуляции и антикоагуляции. Последние регулируют тонус сосудов, их проницаемость, секреторную деятельность эндотелия, реологические свойства крови.

Тактика лечения включает назначение симптоматической терапии, поскольку специфические лекарственные средства отсутствуют. Поэтому сохраняется актуальность проблемы профилактики и лечения острых инфекционных заболеваний (ОИЗ).

Последствия активации системы интерферона включают не только формирование противовирусной защиты неспецифического типа, но и стимуляцию реакций иммунной системы, необходимых для развития гуморального и клеточного иммунного ответа [15].

Определённые успехи в этом направлении могут принести препараты иммуностропного действия [16—20]. Наиболее перспективным и для коррекции иммунных дисфункций являются иммуномодуляторы с первичной интерферониндуцирующей активностью — индукторы эндогенного интерферона (ИИ). ИИ не только оказывают противовирусное действие, но и стимулируют иммунореактивность организма, повышая фагоцитоз нейтрофилов и макрофагов, а также выработку антител. Среди ИИ нового поколения особого внимания заслуживает препарат циклоферон, характеризующийся полифункциональностью в виде широкого спектра фармакологических эффектов [21, 22].

Циклоферон как индуктор интерферонов. Продукция эндогенного интерферона обусловлена наличием чувствительных клеточных систем, способных синтезировать интерферон в ответ на индуктор. Циклоферон индуцирует ранний интерферон 1-го и 2-го типов, сохраняется в течение суток, пик его продукции приходится на 8 часов от момента введения препарата. Семейство Toll-рецепторов (TLR-рецепторы) широко представлено на дендритных клетках, обеспечивая передачу сигналов в ответ на вирусную и бактериальную инфекцию, активируя транскрипционные факторы, вовлечённые в процесс управления неспецифической защитой организма от инфекционного агента, и развитие специфического иммунитета. TLR-рецепторы адаптированы для распознавания фрагментов РНК и ДНК, низкомолекулярных веществ, индуцирующих продукцию интерферонов. В этом плане наиболее интересен индуктор интерферона 1-го и 2-го типа на основе акридонуксусной кислоты (циклоферон), механизм действия которого может быть связан с использованием TLR-7 и TLR-8 — рецепторов [23].

Циклоферон как регулятор цитокинов. При действии различных вирусных агентов и циклоферона индуцируется целый каскад сигналов, которые задействуют «цитокиновую сеть» организма. Активация Th1, продуцирующих ИФН- γ , ИЛ-2 и ФНО- α , ведёт к развитию иммунного ответа по клеточному типу, который играет решающую роль в противовирусной защите. В активации Th1 цитокинов принимает участие ИФН- γ , синтезируемый в ранней фазе вирусной инфекции, а при действии циклоферона отмечена способность индуцировать не только повышенную экспрессию ИЛ-12, но и переключать Th0 с синтеза Th2-цитокинов на Th1-ответ.

Иммуностропная активность циклоферона. В основе развития иммунного дисбаланса лежат функциональная клеточная блокада (блокада рецепторов и механизмов передачи сигналов), дисбаланс клеточных субпопуляций — хелперов

Th1/Th2, супрессоров/цитотоксических лимфоцитов, хелперов/эффекторов и другие. В экспериментальных исследованиях циклоферон индуцирует в линии клеток иммунного происхождения синтез мРНК интерферона- γ и ИЛ-2, а также ИЛ-1 и ИЛ-6. При этом циклоферон не индуцирует мРНК цитокинов в линиях клеток неиммунного происхождения, что свидетельствует о высокой тропности циклоферона к клеткам иммунной системы. Введение циклоферона приводит к существенным изменениям в составе субпопуляций лимфоцитов: повышается относительное и абсолютное число исходно сниженных общих Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD4+), иммунорегуляторного индекса и естественных киллеров (CD16+); снижение CD8+ и CD72+-лимфоцитов. Повышается уровень иммуноглобулина А (IgA) при одновременном снижении концентрации иммуноглобулина Е (IgE). Циклоферон увеличивает провоспалительный потенциал нейтрофилов периферической крови, а также функциональную активность фагоцитирующих клеток за счёт генерации активных форм кислорода, обеспечивая бактерицидность клеток.

Циклоферон как стимулятор образования дефект-интерферирующих вирусных частиц (ДИ-частиц). ДИ-частицы препятствуют нормальной репродукции вируса, что ведёт к подавлению его цитотоксического действия; накопление достаточного количества ДИ-частиц в инфицированном организме приводит к самоограничению инфекции, при этом дефектные частицы сохраняют цитокин- и интерферон (ИФН)-индуцирующие свойства, стимулируя неспецифический иммунитет.

Противовирусная активность циклоферона. Циклоферон оказывает непосредственное противовирусное действие, а также опосредованное через ингибирование функций основных ферментов дыхательной цепи митохондрий клетки — убихинонов, или ингибирование связывания АТФ с митохондриальным АДФ/АТФ зависимым транспортным белком путём специфического ковалентного присоединения акридонуксусной кислоты по пептидной связи лизин-цистеин. Циклоферон восстанавливает способность лейкоцитов крови к синтезу интерферона, подавляет проникновение вирусной частицы в клетку путём ингибирования синтеза мРНК и трансляции вирусных белков, а также через блокирование процессов сборки вирусной частицы и её выхода из инфицированной клетки. В результате связывания молекулы интерферона с интерфероновыми рецепторами на поверхности клеток происходит активация генов, локализованных в 21 хромосоме у человека. Этот процесс сопровождается формированием более 20 новых внутриклеточных белков, способствующих возникновению резистентности к вирусам [24].

Низкая токсичность препарата и полифункциональная фармакологическая его активность, позволяют применять препарат в качестве средства профилактики и лечения различных вирусных инфекций.

Цель исследования заключалась в изучении влияния циклоферона при лихорадке долины Рифт (ЛДР) у животных с иммунодефицитом, изучении особенностей клинической картины и лабораторных изменений при крымской геморрагической лихорадке (КГЛ); а также в оценке влияния на клиническое течение заболевания противовирусных препаратов (рибавирина в комбинации с раствором циклоферона), таблетированной формы циклоферона в комплексной терапии больных КГЛ.

Материал и методы

Экспериментальная часть. Исследования выполнены на белых беспородных мышах (1000 мышей массой 16—18 г и 690 мышей массой 10—12 г.) В опыт брали животных, в обязательном порядке выдержавших карантин в течение 1 недели в клинике экспериментальных биологических моделей НИИЦ (МБЗ) ГНИИИВМ МО РФ.

Применительно к каждому возбудителю величину ЛД₅₀ определяли на белых беспородных мышах с расчётом этого критерия по методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина и А. А. Воробьева. Вирусы венесуэльского энцефаломиелимита лошадей (ВЭЛ) и оспы хищных (ОХ) накапливали путём культивирования на развивающихся куриных эмбрионах. Накопление вируса лихорадки долины Рифт (ЛДР) проводили посредством интрацеребрального заражения мышей-сосунков. Инфекционную активность вирусосодержащих материалов определяли по методу Рида-Менча титрованием на мышах-сосунках или же половозрелых мышах.

Биологическую активность индукторов интерферона (циклоферона, амиксина и ридостина) оценивали *in vivo*, по сопоставлению величин показателей выживаемости животных в опытных и контрольных группах. Защитную эффективность лекарственных средств на экспериментальных моделях ВЭЛ и ЛДР оценивали при подкожном заражении животных, а на модели оспы хищных — при интраназальном введении соответствующего возбудителя.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 14—21 суток. Процент выживших животных в опытных и контрольных группах определяли по таблицам В. С. Генеса [25].

Моделирование иммунодефицитного состояния у мышей проведено введением внутрибрюшинно циклофосфамида в дозах 100—200 мг/кг либо за 72—24 часа до, либо в первые трое суток после заражения.

Клиническая часть. В исследование включено 410 больных со среднетяжёлой и тяжёлой формами верифицированной крымской геморрагической лихорадки (КГЛ). Диагноз заболевания подтверждался серологическими исследованиями — обнаружением IgM к вирусу КГЛ (методом ИФА) в диагностических титрах, а также на основании клинической картины, характерных эпидемиологических данных, анализа периферической крови. Больные были рандомизированы в три группы: первую группу ($n=112$) составили больные, получавшие только базисное лечение препаратами патогенетической и симптоматической направленности. Больные второй группы ($n=158$) наряду с базисной терапией получали индуктор синтеза интерферона 1-го и 2-го типа (циклоферон) в таблетках. Третьей группе больных ($n=140$) в качестве этиотропного лечения назначали комбинацию противовирусного препарата рибавирин с раствором циклоферона (НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург).

Оценке подлежали следующие лабораторные тесты:

— степень повышения температуры определяли по шкале (Веселкин П.Н., 1980 г.): субфебрильная (37—38°C), умеренно повышенная (38,1—39°C), высокая (39,1—40°C), чрезмерно высокая (40,1—41°C), гиперпиретическая (выше 41°C);

— физикальное обследование больных проводилось по общепринятой врачебной схеме: при исследовании кожных покровов оценивали наличие первичного аффекта и его локализацию, характер сыпи, её распространённость, локализацию и количество;

— у больных КГЛ осуществлялись стандартные лабораторные исследования.

В комплексное лечение больных КГЛ были включены следующие препараты: противовирусный препарат рибавирин и индуктор синтеза эндогенного интерферона — циклоферон в двух лекарственных формах — раствор для инъекций 125 мг/1 мл и таблетированная форма циклоферона по 150 мг.

Рандомизация больных осуществлялась с применением «метода конвертов».

Циклоферон в таблетках (150 мг) назначался перорально из расчёта 10 мг/кг массы тела, ежедневно (в среднем 4—5 таблеток на приём), курс лечения — 10 дней.

Рибавирин назначался в дозе 1000—1200 мг/сут перорально в два приёма. Курс лечения — до 8 дней. Курсовая доза 19200 мг.

Раствор циклоферона (250 мг/2 мл) вводился по 4,0 мл (500 мг) внутривенно ежедневно. Курс лечения — 10 инъекций (5000 мг).

Препараты назначались на фоне базисной, максимально унифицированной терапии.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили на персональном компьютере, используя набор специальных программ, реализующих традиционные статистические методы.

Результаты и обсуждение

Экспериментальная оценка эффективности индукторов интерферона. Проведена оценка индукторов эндогенного интерферона: циклоферона, амиксина, ридостина при экспериментальных особо опасных вирусных инфекциях (ОВИ): венесуэльском энцефалите (ВЭЛ), лихорадке долины Рифт (ЛДР) и оспе хищных (ОХ) в экспериментах на животных с нормально функционирующей иммунной системой и при иммунодефицитных состояниях.

Для моделирования иммунодефицитного состояния использовали циклофосфамид (ЦФА), который вводили животным внутрибрюшинно в дозе 200 мг/кг либо за 24 ч, либо за 120 ч до заражения.

Число животных в каждой группе составляло 10 особей. Заражающая доза возбудителя в модели экспериментальной инфекции ВЭЛ — 8 ЛД₅₀, при экспериментальной ЛДР — 10 ЛД₅₀, при экспериментальной ОХ — 15 ЛД₅₀.

При экспериментальной инфекции ВЭЛ у животных с нормально функционирующей иммунной системой все препараты обладали определённым защитным действием. При профилактическом применении индукторов интерферонотропного действия выживаемость инфицированных мышей на фоне 100% летальности в контроле составляла 30—50%, причём наиболее эффективным оказалось приме-

нение циклоферона. При применении исследуемых препаратов по лечебно-профилактическим схемам выживаемость инфицированных вирусом ВЭЛ животных достигала 50—70% на фоне 100% летальности в контроле.

Не менее эффективным оказалось применение индукторов интерферона у животных инфицированных вирусом ЛДР или вирусом ОХ. Так, в результате профилактического применения циклоферона у животных, инфицированных вирусом ЛДР, достигалось увеличение выживаемости до 80% по сравнению со 100% летальностью в контроле. Однократное введение циклоферона в дозе 150 мг/кг за 4 ч до заражения вирусом ЛДР способствовало повышению выживаемости инфицированных мышей до 80% ($p < 0,05$), а назначение в дозе 150 мг/кг в лечебно-профилактических целях обеспечивало максимально возможную защиту 100% инфицированных животных, что на 50% превышало эффективность амиксина и на 100% — контрольный уровень.

В отношении экспериментальной ОХ применение индукторов интерферона по профилактическим схемам обеспечивало повышение выживаемости инфицированных мышей до 80% (циклоферон), 55% (амиксин) и 50% (ридостин) на фоне 100% летальности в контроле.

На рис. 1 представлены результаты выживаемости мышей при однократном введении циклоферона. Выживаемость животных в экспериментальной группе составила 80% ($p < 0,05$) при 100% гибели в контрольной группе. Не менее эффективным в отношении экспериментальной инфекции ЛДР оказалось применение циклоферона по курсовой схеме. Циклоферон в дозе 150 мг/кг обеспечивал 100% защиту инфицированных животных при 100% гибели в контрольной группе (рис. 2), свидетельствуя о возможности применения циклоферона для терапии ЛДР.

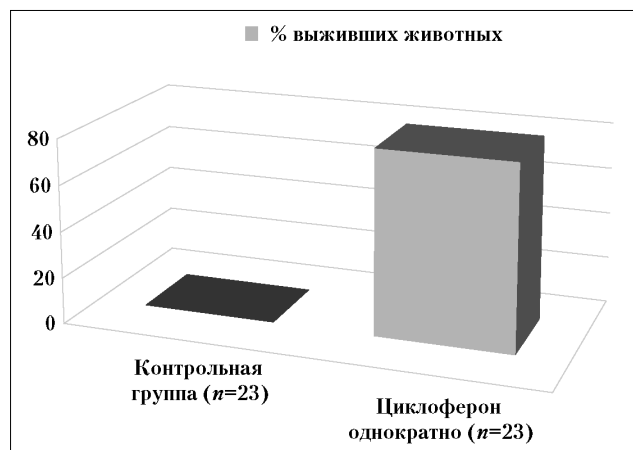


Рис. 1. Защитная эффективность циклоферона при однократном введении до заражения ЛДР.

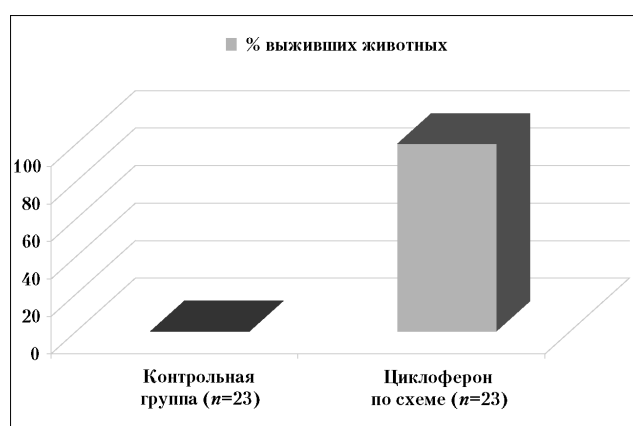


Рис. 2. Защитная эффективность циклоферона при многократном введении в отношении ЛДР.

Для моделирования иммунодефицитного состояния у животных использовали циклофосфамид (ЦФА), подавляющий иммунный ответ при

Таблица 1. Защитная эффективность циклоферона в отношении ЛДР на фоне вторичного иммунодефицитного состояния, вызванного ЦФА

Препарат	Срок введения препарата относительно заражения, ч	Разовая доза вводимого препарата, мг/кг	Заражающая доза возбудителя, количество ЛД ₅₀	Выживаемость инфицированных животных, %	СГПЖ, сут
ЦФА	за 120 ч до заражения	200	10	0 (0—17)	6,2
	за 24 ч до заражения	200	10	0 (0—17)	5,8
ЦФА + циклоферон	за 120 ч до заражения	200	10	50 (27—73)*	28,6
	за 4 ч до заражения	150			
ЦФА + циклоферон	за 24 ч до заражения	200	10	30 (12—54)	14,8
	за 4 ч до заражения	150			
ЦФА + циклоферон	за 120 ч до заражения	200	10	70 (46—88)*	50,0
	за 24 ч до, через 24, 48, 72, 144 ч после заражения	150			
ЦФА + циклоферон	за 24 ч	200	10	50 (27—73)*	22,2
	за 24 ч до, через 24, 48, 72, 144 ч после заражения	150			
Контроль вируса	—	—	10	0 (0—17)	6,0

Примечание. * — различия с величинами выживаемости инфицированных животных в контрольной группе достоверны, $p < 0,05$.

введении его до или после антигенной стимуляции, а также одновременно с ней.

Под влиянием ЦФА в организме экспериментальных животных происходит формирование иммунодефицитного состояния. Наиболее отчетливо эти изменения регистрируются при использовании иммуносупрессора в разовой дозе 200 мг/кг, а их длительность составляет 5 суток (120 часов) с момента введения ЦФА.

Циклоферон вводили подкожно в дозе 150 мг/кг однократно за 24 ч до заражения или многократно за 24 ч до и через 24, 48, 72, 144 ч после заражения.

Однократное введение циклоферона мышам, ранее получавшим ЦФА, защищало от гибели 30–50% инфицированных вирусом ЛДР мышей. Многократное применение циклоферона в условиях вторичного иммунодефицита в отношении экспериментальной ЛДР оказалось более эффективным. Выживаемость инфицированных животных в этом случае колебалась в пределах 50–70%, а величина средне групповой продолжительности жизни (СГПЖ) — в пределах 22,2–50 суток (табл. 1).

Таким образом, курсовое введение циклоферона, по сравнению с однократным, обеспечило высокую защиту животных с иммунодефицитом при экспериментальной ЛДР.

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что испытанные индукторы интерферона обладают защитным эффектом в отношении ВЭЛ, ЛДР и ОХ, при этом степень выраженности протективного эффекта распределяется следующим образом: при ВЭЛ — циклоферон > амиксин = ридостин; при ЛДР — циклоферон > амиксин > ридостин; при ОХ — циклоферон > амиксин = ридостин. Проведенный анализ свидетельствует о наибольшей эффективности циклоферона при ВЭЛ, ЛДР и ОХ, что позволяет считать данный препарат в качестве приоритетного средства профилактики и терапии ОВИ. Циклоферон обладает наиболее выраженными, по сравнению с амиксином и ридостином, протективными свойствами при экспериментальных ОВИ — ВЭЛ, ЛДР, ОХ в не зависимости от состояния иммунной системы.

Клинико-лабораторная оценка эффективности комплексного лечения крымской геморрагической лихорадки. Активация природного очага КГЛ в ЮФО России привела к росту заболеваемости. Поэтому изучение клинико-лабораторных проявлений инфекции и совершенствование этиотропной (противовирусной) терапии является весьма актуальным.

Среди наблюдаемых больных КГЛ преобладали мужчины (67,3%), что связано с родом работы больных и более частым пребыванием их на природе (охота, рыбалка). Возраст больных колебался от 17 до 78 лет. Средний возраст больных КГЛ составил $44,5 \pm 1,09$ лет.

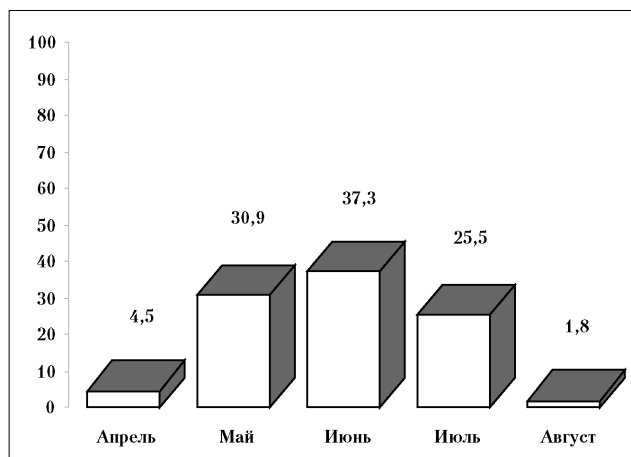


Рис. 3. Сезонное распределение больных КГЛ (в %).

Заболевшие были преимущественно жителями сельской местности (78,3%). Городские жители (22,7%) заражались при выезде на дачные участки и для отдыха на природе. При КГЛ отмечена четко выраженная весенне-летняя сезонность — с апреля по август (рис. 3). Как показано на рис. 3 максимальный подъем заболеваемости КГЛ наблюдался в июне (37,3%). Заболевали лица, имеющие контакт с животными, на которых обитают иксодовые клещи рода *Hyalomma marginatum* во взрослой стадии (имаго). Укусы клещей отмечали 70% больных, контакт с клещами — 20,0%. Укусы клещей чаще наблюдались на нижних конечностях (45,4%), реже на туловище (24,7%) и на верхних конечностях (20,8%).

9,1% больных снимали клещей с головы (ухо, заушная область) и шеи. Более половины больных (58,2%) — работающие. КГЛ заболевали люди различных профессий: зоотехники, ветеринары, чабаны, овощеводы, механизаторы и др. Неработающих было 41,8% больных, из них пенсионеров — 19,1%.

В большинстве случаев больные обращались за медицинской помощью на 3–4-е сутки болезни. В первые 3 дня болезни госпитализировано 47,3% больных, на 4–6-й день — 39,1% больных, на 7–9 день — 12,7% больных и на 10-й день — менее 1% больных (0,9%).

Сопутствующие заболевания выявлены у 41,8% больных. Наиболее часто регистрировались заболевания сердечно-сосудистой системы (17,3%): ишемическая болезнь сердца, атеросклероз сосудов, симптоматическая гипертония, мерцательная аритмия, гипертоническая болезнь. Хронический бронхит был у 5,5% больных, хронический гепатит токсико-алиментарной этиологии — у 4,3% больных, хронический вирусный гепатит С — в 2% случаев, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки — у 1,2%, хронический алкоголизм — в 2,1% случаев. В единичных случаях сопутствующими диагнозами

были сахарный диабет, туберкулёз лёгких, дифиллоботриоз, болезнь Верльгофа, хронический пиелонефрит.

В зависимости от выраженности лихорадки, комплекса симптомов интоксикации, степени поражения различных органов и систем выделения тяжёлая (34,5%) и среднетяжёлая (65,5%) формы болезни. У 6,4% больных с тяжёлой формой КГЛ наступил летальный исход. Средний койко-день у больных КГЛ составил $17,2 \pm 0,38$.

Комплексное лечение 410 больных КГЛ включало этиотропную, патогенетическую терапию. Больные получали лечение с учётом формы тяжести и стадии инфекционного процесса.

В соответствии с задачами исследования была проведена оценка эффективности применения этиотропных препаратов, которые назначались в комплексном лечении, по сравнению с контрольной группой больных, получавших только базисную терапию. Контрольную группу (первая группа) составили 112 больных в возрасте от 18 до 65 лет.

Больные второй группы (158 человек) были в возрасте от 17 до 63 лет. В комплексное лечение больных данной группы был включен отечественный пероральный циклоферон в таблетированной форме, который назначался больным по схеме, представленной в инструкции по медицинскому применению, из расчёта 10 мг/кг массы тела.

Больные третьей группы (140 человек) в возрасте от 25 до 69 лет в качестве этиотропного лечения получали рибавирин в комбинации с раствором циклоферона. Рибавирин назначался в дозе 1000 мг/сут (при весе больного до 75 кг) и 1200 мг/сут (при весе более 75 кг) перорально в два приёма. Курс лечения — до 8 дней. Циклоферон вводился по 4 мл (500 мг) внутривенно один раз в сутки. Курс лечения (5000 мг) — 10 инъекций циклоферона.

Рибавирин + раствор циклоферона, а также таблетки циклоферона назначались в ранние сроки болезни — с 1-го по 5-й день заболевания. Серьёзных побочных реакций при использовании препаратов, требующих их отмены, не было.

Эффективность применения циклоферона в таблетках и рибавирина в комбинации с раствором циклоферона на фоне патогенетической терапии оценивали по продолжительности симптомов интоксикации и геморрагических проявлений, развитию осложнений и срокам пребывания больных в стационаре. Результаты сравнительной оценки эффективности применения циклоферона в таблетках (вторая группа) в сравнении с патогенетическим лечением КГЛ (первая группа) представлены в табл. 2.

У больных, пролеченных таблетированной формой циклоферона, продолжительность лихо-

радки и синдрома интоксикации со дня лечения была достоверно короче ($p < 0,001$ и $p < 0,01$), чем у больных, получавших базисную терапию. У больных II группы основные симптомы интоксикации — слабость, головная боль, миалгии, артралгии, тошнота, рвота, нарушение сна и аппетита были менее продолжительными (на 1,3—2,3 дней), чем у пациентов I группы. У больных II группы по сравнению с I группой быстрее происходило угасание геморрагической сыпи (на 1,88 дня), уменьшение размеров печени (на 1,42 дня) и разрешение ПА (на 1,53 дня).

У больных, леченных таблетками циклоферона, геморрагическая сыпь регистрировалась реже (66,7%), чем у больных I группы (75,0%). Угасание сыпи у этих больных происходило быстрее, чем в I группе ($p < 0,01$). У больных II группы кровотечения развивались реже, но достоверного различия с I группой не было ($p > 0,05$). Во II группе кровоточивость десен была у 44,4% больных, носовые кровотечения — у 33,3% больных, желудочно-кишечные — у 22,2% пациентов. В I группе кровоточивость десен была у 50% пациентов, носовые кровотечения встречались в 40% случаев, а желудочно-кишечные — в 30,0% случаев. Однако продолжительность кровотечений у больных II группы была меньше, чем у больных I группы ($p < 0,05$).

Изменения со стороны крови у больных II и I групп были примерно одинаковы. Так, лейкопения во II группе была в 72,2% случаев (в I группе — 75,0%), тромбоцитопения во II группе регистрировалась в 83,3% случаев (в I группе — 85,0%). Нормализация показателей крови у больных II группы происходила достоверно быстрее ($p < 0,05$), чем у больных I группы. У больных II группы нормализация количества лейкоцитов в периферической крови произошла на 1,8 дня раньше, а количество тромбоцитов — на 2,3 дня раньше, чем у больных I группы.

Тяжёлая форма болезни была у 27,8% больных II и у 35,0% больных I группы. Среднетяжёлая форма наблюдалась у 72,2% больных II группы и у 65,0% больных I группы. У больных, леченных таблетками циклоферона, в 2 раза реже развивались осложнения (22,2%), чем у больных, получавших базисное лечение (45,0%). Летальных исходов у наблюдаемых больных не было.

Средний койко-день у больных II группы был на 2,2 дня короче ($p < 0,05$), чем у больных I группы (соответственно $16,3 \pm 0,65$ и $18,5 \pm 0,72$).

Лечение рибавирином в комбинации с раствором циклоферона проведено 140 больным (III группа). Средний возраст больных $45,8 \pm 2,46$ лет. Лечение назначалось в среднем на $3,6 \pm 0,28$ дня. Эффективность комплексного лечения с использованием рибавирина в комбинации с раствором циклоферона оценивали по продолжительности

Таблица 2. Сравнительные данные продолжительности (в днях) симптомов КГЛ у больных, получавших базисную терапию и циклоферон в таблетках, $M \pm m$

Симптомы	Базисное лечение, I группа ($n=112$), $M \pm m$	Лечение циклофероном в таблетках, II группа ($n=158$), $M \pm m$	Сравнение II к I	
			критерий Стьюдента	p
День от начала лечения	4,12±0,42	3,62±0,26	1,0	>0,05
Продолжительность лихорадки со дня лечения	5,62±0,36	3,53±0,32	4,35	<0,001
Продолжительность интоксикации со дня лечения	8,47±0,48	6,17±0,45	3,48	<0,01
Слабость	8,47±0,48	6,17±0,45	3,48	<0,01
Головная боль	5,28±0,36	3,08±0,27	4,89	<0,001
Миалгии	5,73±0,38	3,63±0,32	4,67	<0,001
Артралгии	5,56±0,37	3,21±0,27	5,11	<0,001
Тошнота	5,24±0,54	3,26±0,38	3,0	<0,01
Рвота	3,67±0,33	2,38±0,34	2,74	<0,02
Снижение аппетита	7,14±0,43	5,12±0,47	3,21	<0,01
Нарушение сна	4,72±0,38	3,16±0,41	2,78	<0,02
Боли в животе	3,43±0,45	2,58±0,31	1,57	>0,05
Гепатомегалия	7,28±0,43	5,86±0,39	2,45	<0,05
Жидкий стул	3,39±0,56	2,44±0,58	1,19	>0,05
1-й день угасания сыпи	6,13±0,37	4,25±0,36	3,62	<0,01
Разрешение ПА	8,67±0,56	7,14±0,45	2,94	<0,01
Боли в поясничной области	4,32±0,45	3,24±0,37	1,86	>0,05
Олигурия	3,33±0,48	2,75±0,73	0,67	>0,05
Кровоточивость десен	5,43±0,41	4,12±0,37	2,38	<0,05
Кровотечения				
носовые	3,42±0,37	2,24±0,32	2,41	<0,05
желудочно-кишечные	5,37±0,48	4,13±0,49	1,8	>0,05
Сроки нормализации количества лейкоцитов	9,15±0,52	7,35±0,42	2,69	<0,02
Сроки нормализации количества тромбоцитов	10,24±0,61	7,94±0,45	3,03	<0,01
Койко-день	18,54±0,72	16,35±0,65	2,26	<0,05

Таблица 3. Продолжительность (в днях) основных симптомов у больных КГЛ, $M \pm m$

Симптомы	Базисное лечение, I группа ($n=112$), $M \pm m$	Лечение Р±ЦФ, III группа ($n=140$), $M \pm m$	Сравнение III к I	
			критерий Стьюдента	p
День от начала лечения	4,12±0,42	3,58±0,28	0,98	>0,05
Продолжительность лихорадки со дня лечения	5,62±0,36	2,12±0,17	8,75	<0,001
Продолжительность интоксикации со дня лечения	8,47±0,48	5,27±0,28	5,71	<0,001
Слабость	8,47±0,48	5,27±0,28	5,71	<0,001
Головная боль	5,28±0,36	2,31±0,17	7,43	<0,001
Миалгии	5,73±0,38	2,78±0,26	4,68	<0,001
Артралгии	5,56±0,37	2,51±0,21	7,09	<0,001
Тошнота	5,24±0,54	3,12±0,38	3,37	<0,01
Рвота	3,67±0,33	1,69±0,21	5,08	<0,001
Снижение аппетита	7,14±0,43	4,28±0,39	4,93	<0,001
Нарушение сна	4,72±0,38	2,43±0,26	4,98	<0,001
Боли в животе	3,43±0,45	2,23±0,27	2,31	<0,05
Гепатомегалия	7,28±0,43	5,42±0,35	3,38	<0,01
Жидкий стул	3,39±0,56	2,25±0,37	1,71	>0,05
1-й день угасания сыпи	6,13±0,37	3,78±0,29	5,0	<0,001
День разрешения ПА	8,67±0,56	6,72±0,45	2,71	<0,02
Боли в поясничной области	4,32±0,45	2,27±0,34	3,66	<0,01
Олигурия	3,18±0,48	2,34±0,32	1,45	>0,05
Кровоточивость десен	5,43±0,52	3,42±0,37	3,14	<0,01
Кровотечения				
носовые	3,12±0,37	2,01±0,32	2,26	<0,05
желудочно-кишечные	5,33±0,65	3,33±0,68	2,2	<0,05
Сроки нормализации количества лейкоцитов	9,15±0,52	6,59±0,35	4,06	<0,001
Сроки нормализации количества тромбоцитов	10,24±0,61	7,13±0,42	4,2	<0,001
Койко-день	18,54±0,72	15,44±0,56	3,41	<0,01

симптомов и наличие статистически достоверного различия по сравнению с контрольной группой больных (I группа), получавших только базисное лечение (табл. 3).

Лечение больных КГЛ рибавирином и раствором циклоферона оказывало положительный эффект на течение болезни (см. табл. 3). У большинства больных после 1—2 дней лечения наступало

критическое снижение температуры. Продолжительность лихорадки на фоне лечения составила $2,12 \pm 0,17$ дня (у больных I группы — $5,62 \pm 0,36$). Лихорадка у больных III группы была на 3,5 дня короче, чем у больных I группы ($p < 0,001$). Продолжительность синдрома интоксикации в III группе также была на 3,2 дня короче, чем в I группе (соответственно $5,27 \pm 0,28$ и $8,47 \pm 0,48$ дня). Симптомы интоксикации — слабость, головная боль, миалгии, артралгии, нарушение сна, аппетита у больных III группы были менее продолжительными, чем у больных I группы ($p < 0,001$). В III группе больных на 2,35 дня раньше исчезала геморрагическая сыпь на коже, на 1,35 дня раньше разрешался ПА, чем у больных I группы ($p < 0,01$). У больных III группы реже развивались геморрагические проявления, чем в I группе. Так, в III группе десневые кровотечения отмечены в $31,8 \pm 10,16\%$, носовые — в $27,3 \pm 9,27\%$, а желудочно-кишечные — в $13,6 \pm 7,48\%$ случаев. У больных I группы кровоточивость десен встречалась в $50,0 \pm 11,47\%$, носовые кровотечения — в $40,0 \pm 11,24\%$, а желудочно-кишечные — в $30,0 \pm 9,72\%$ случаев. Продолжительность геморрагического синдрома у больных III группы была меньше, чем у больных I группы ($p < 0,05$). Длительность десневых кровотечений была на 2,01 дня короче у больных III группы по сравнению с пациентами I группы ($p < 0,01$). У больных, леченных рибавирином и раствором циклоферона, продолжительность носовых и желудочно-кишечных кровотечений была короче ($p < 0,01$ и $p < 0,05$), чем у больных, получавших базисную терапию. Сроки нормализации количества лейкоцитов и тромбоцитов также сокращались у больных III группы (соответственно на 2,56 и 3,11 дня), по сравнению с больными I группы. У больных III группы тяжёлая форма болезни была в $22,7 \pm 9,14\%$ случаев, среднетяжёлая — в $77,3 \pm 9,14\%$ (против $35,0 \pm 10,94\%$ и $65,0 \pm 10,94\%$ у больных I группы). Осложнения у больных III группы наблюдались в 2 раза реже, чем у больных I группы.

Пребывание больных III группы в стационаре было на 3,1 дня короче ($p < 0,01$), чем у больных I группы (средний койко-день соответственно составил $15,44 \pm 0,56$ и $18,54 \pm 0,72$ дня).

Приводим клинический пример лечения больного тяжёлой формой КГЛ рибавирином в комбинации с раствором циклоферона.

Больной К., 45 лет, житель г. Астрахани, поступил в ОИКБ 4.07.03 с диагнозом АРЛ. При поступлении предъявлял жалобы на высокую температуру, выраженную слабость, головную боль, боли в мышцах, суставах, тошноту, рвоту, боли в поясничной области.

Анамнез болезни: заболел остро 2.07.03. Температура тела с ознобом повысилась до 39°C , а к вечеру до 40°C . Больного беспокоили артралгии, миалгии, боли в поясничной области и в животе, общая слабость. На следующий день

температура тела оставалась высокой — $39,6^\circ\text{C}$, появились тошнота, многократная рвота, исчез аппетит. На 3-й день болезни отмечалось носовое кровотечение. На 3-й день болезни госпитализирован.

Эпидемиологический анамнез: работает сварщиком по вахтовому методу на газоперерабатывающем комплексе в Красноярском районе Астраханской области. За 1 день до болезни снял 2 клещей с уха и стопы.

Объективно: состояние больного тяжёлое. Температура тела $39,8^\circ\text{C}$. На коже туловища и конечностей необильная эритематозно-папулёзная сыпь красного цвета. На нижних конечностях и в подмышечных впадинах небольшое количество петехий синюшного цвета. На правой ушной раковине имеется ПА диаметром 9 мм, округлой формы с красным венчиком, в центре коричневая корочка диаметром 5 мм. Периферические лимфоузлы не увеличены. Выраженный конъюнктивит и склерит. Имеются кровоподтёки различных размеров на ягодицах, в локтевых ямках. Тоны сердца глухие, тахикардия. Пульс 118 в минуту слабого наполнения. Артериальное давление 80/50 мм рт.ст. Язык сухой, обложен желтоватым налётом. Живот при пальпации мягкий, умеренно болезненный в правом подреберье. Пальпируется нижний край печени на 3,0–4,0 см ниже реберной дуги. Селезёнка не увеличена. Симптом Пастернацкого положительный. Олигурия. Моча насыщенная. В сознании. Больной вялый, адинамичный. Менингеальных симптомов нет.

Клинический диагноз: крымская геморрагическая лихорадка с геморрагическим синдромом, тяжёлая форма.

Осложнение: инфекционно-токсический шок II степени.

Лабораторные данные (3-й день болезни). Анализ крови: Эр. — $3,8 \times 10^{12}/\text{л}$, Hb — 142 г/л; лейкоциты — $3,4 \times 10^9/\text{л}$, п. — 12%, с. — 73%, лимфоциты — 13%, моноциты — 2%; СОЭ — 10 мм/час; тромбоциты — $115,8 \times 10^9/\text{л}$ (300/00). В последующие дни количество тромбоцитов снизилось до $48,7 \times 10^9/\text{л}$ (140/00). Определена агрегационная функция тромбоцитов на 5-й день болезни: отмечается значительное снижение степени агрегации, скорости агрегации и времени её максимального достижения. Определяется уменьшение размеров агрегатов и увеличение времени их формирования.

В крови больного (на 7-й день болезни) обнаружены IgM к вирусу КГЛ методом ИФА — титр антител 1:1600.

Проводимая терапия. Противовирусная терапия назначена на 3-й день болезни: рибавирин 1200 мг/сут (5 дней), циклоферон по 4,0 мл внутривенно (10 дней). Дезинтоксикационная и противошоковая терапия (реамберин 1,5% раствор, глюкоза, полиионные растворы, СЗП, преднизолон), гемостатические препараты, сердечно-сосудистые средства.

В результате интенсивной терапии состояние больного стабилизировалось: тахикардия сменилась брадикардией (число сердечных сокращений 55–62 в минуту). Артериальное давление нормализовалось на 2-е сутки лечения. Температура тела снизилась на 2-й день лечения, продолжительность интоксикации составила 5 дней. Несмотря на наличие тромбоцитопении и тромбоцитопатии полостных кровотечений не было. Геморрагическая сыпь исчезла на 3-и сутки лечения. Количество тромбоцитов нормализовалось на 7-й день болезни. Выписан в удовлетворительном состоянии на 18-й день болезни.

Приводим клинический случай лихорадки Денге (Лаос, июнь 2009 г.).

Среди больных, поступивших в госпиталь летом 2009 года, более чем в 10% случаев регистрировалась лихорадка Денге. Так как этиотропной терапии при этом заболевании не существует, большинству пациентов рекомендовалось в качестве дезинтоксикационной терапии введение реамберина (1,5% раствор для инфузий). Препарат вводился внутривенно капельно из расчёта 10 мл/кг массы в течение 5–7 дней в зависимости от выраженности степени интоксикации. Самая тяжёлая форма лихорадки Денге — геморрагическая. За время

работы в госпитале был 1 случай, у больной Б., 11 лет. Ребёнок поступил 9.05.09 в 23.30, на 4-й день болезни, с жалобами на лихорадку выше 39°C в течение 4 дней, головные боли, боли в мышцах, однократную рвоту, боли в животе. При осмотре в приёмном покое вялая, выражена интоксикация, выявлена петехиальная сыпь на руках и ногах, экхимозы в местах инъекций, положительный симптом жгута. Из лабораторных данных — гематокрит 45%, лейкоциты $5,4 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты — $19,8 \times 10^9/\text{л}$. Поставлен диагноз: лихорадка Денге, геморрагическая форма, I стадия.

Была начата инфузионная терапия плазмаглюкином, однако к 6.00 10.05 состояние девочки стало ухудшаться. Появилось беспокойство, затруднение дыхания, отмечался акроцианоз и похолодание конечностей. АД — 70/60 мм рт. ст., ЧСС — 120 уд. в 1 мин., Т — 36,5°C, ЧДД — 36 в 1 мин. Пациентка переведена в отделение реанимации в состоянии шока I степени, в терапию добавлен раствор Рингера и гемотрансфузия 200 мл. После терапии гематокрит 45%, уровень тромбоцитов $62 \times 10^9/\text{л}$, Т — 37,5°C, ЧСС — 104 уд. в 1 мин, АД — 120/80 мм рт. ст.

В 21.00 состояние ребёнка оставалось тяжёлым. Сохранялись геморрагическая сыпь, экхимозы в местах инъекций, акроцианоз, затруднение дыхания, беспокойство, боли в животе. Появилась иктеричность кожи, склер, асцит. В лёгких — перкуторно укорочение справа. Мочи мало, темного цвета.

При осмотре 11.05 в 14.00 состояние ребёнка тяжёлое, но стабильное. Сонливая, вялая. Жалобы на боли в животе. Кожа, склеры иктеричные. Менингеальные симптомы отрицательные. По катетеру отходит темная моча, за ночь 200 мл. Сохраняется петехиальная сыпь на руках, животе, экхимозы в местах инъекций, свежих элементов не видно. ЧДД — 28 в 1 мин., в лёгких дыхание жёсткое, хрипов нет. ЧСС — 115 уд. в мин, тоны сердца приглушены, ритмичные. Язык обложен белым налетом. Асцит. Живот доступен глубокой пальпации, болезненный в эпигастрии и правом подреберье. Печень до 3 см ниже реберной дуги, средней плотности. Селезёнка не увеличена. Общий билирубин — 3,0 мг/дл, АЛТ — 1262 Ед/л, АСТ — 323 Ед/л, щелочная фосфатаза — 304 Ед/л, гематокрит — 58%, тромбоциты — $114 \times 10^9/\text{л}$. Начата инфузионная терапия 1,5% раствором реамберина из расчёта 10 мл/кг массы тела.

12.05. Состояние девочки по заболеванию тяжёлое, однако самочувствие гораздо лучше. Появился аппетит, хорошо пьёт. Дыхание не затруднено, ЧДД — 22 в 1 мин. Кожа, склеры иктеричные, но светлее. В лёгких без притупления. Живот мягкий, асцит минимальный. Печень до 2 см. ниже реберной дуги, чувствительная. Моча более светлая, диурез адекватный. Продолжена терапия реамберин и начато внутримышечное введение раствора циклоферона 12,5% по 2 мл (250 мг), ежедневно в течение в 7 дней.

14.05. Состояние ребёнка удовлетворительное. Активная. С аппетитом ест, пьёт. Жалоб не предъявляет. Кожа чистая, краевая иктеричность склер. ЧДД — 22 в мин., дыхание не затруднено, перкуторно без притупления. Тоны сердца ясные,

ритмичные, ЧСС — 88 уд. в 1 мин. Асцита нет. Живот мягкий, безболезненный. Печень до 1,5 см ниже реберной дуги, средней плотности. Катетер удален, девочка мочится самостоятельно. Моча светлая, с утра насыщенная. Рекомендовано закончить введение реамберина. Циклоферон продолжать по схеме.

18.05. Ребёнок выписан домой в удовлетворительном состоянии.

28.05. Амбулаторно на приёме. Жалоб нет. Кожа, склеры чистые, светлые. Тоны сердца ясные, ритмичные. Живот мягкий, безболезненный. Печень у края реберной дуги. АЛТ — 25 Ед/л, АСТ — 34 Ед/л.

Таким образом, изученные индукторы интерферона обладают защитным эффектом в отношении ВЭЛ, ЛДР и ОХ. Степень выраженности протективного эффекта распределяется следующим образом: при ВЭЛ — циклоферон > амиксин = ридостин; при ЛДР — циклоферон > амиксин > ридостин; при ОХ — циклоферон > амиксин = ридостин, свидетельствуя о наибольшей эффективности циклоферона при ВЭЛ, ЛДР и ОХ, что позволяет считать данный препарат в качестве приоритетного средства профилактики и терапии ОВИ. Циклоферон обладает наиболее выраженными, по сравнению с амиксином и ридостином, протективными свойствами при экспериментальных ОВИ — ВЭЛ, ЛДР и ОХ вне зависимости от состояния иммунной системы.

При своевременном (раннее применение в первые 1—4 дня заболевания) назначении комплексной терапии с включением этиотропных (противовирусных) препаратов (циклоферон, рибавирин) отмечается уменьшение до 34,5% случаев тяжёлых форм болезни, снижение до 67,2% проявлений геморрагического синдрома, включая и минимизацию до 44,5% полостных кровотечений.

Рибавирин в комбинации с раствором циклоферона, циклоферон в таблетированной форме сокращают длительность лихорадки (на 2,1—3,5 дня), синдром интоксикации (на 2,3—3,2 дня), способствуют более раннему разрешению геморрагической сыпи (на 1,9—2,4 дня), уменьшая частоту и продолжительность геморрагического синдрома, частоту осложнений, сокращая сроки пребывания больных в стационаре (на 2,2—3,1 дня) и улучшая прогноз заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Heegaard E. D. Biological weapons and biological defence in Denmark. Ugeskr. Laeger 2005; 36: 3381—3384.
2. Спиринов А. С. Современные биотехнологии: наука и жизнь. Человечество 1998; 5: 5—11.
3. Cuneo K. Crisis Res J 2005; 3: 50—52.
4. Ron L. D. Emerg Infect Dis 2002; 2: 18—24.
5. Sheppard B., Rubin G. J., Wardman J. K., Wessely S. Terrorism and dispelling the myth of a panic prone public. J Public Health Polic 2006; 3: 219—245.
6. Bakonyi T., Hubálek Z., Rudolf I., Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. Emerg Infect Dis 2005; 11: 2: 225—231.
7. Онищенко Г. Г. Вестн рос акад наук 2003; 3: 194—204.
8. Львов Д. К., Клименко С. М., Гайдамович С. Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.: 1989.
9. Сомов Г. П., Беседнова Н. Н. Геморрагические лихорадки. Л.: 1981; 200.
10. Жданов В. М. Эволюция вирусов. М.: 1990; 376.
11. Артсб Х., Форд-Джоунс Л. Арбовирусные инфекции. Инфекционные болезни у детей. М.: 2006; 464—472.
12. Инфекционные болезни: национальное руководство /Под ред. Н. Д. Ющука, Ю. Я. Венгерова. М.: 2009; 832.
13. Хан А. Геморрагические лихорадки / Инфекционные болезни у детей. М.: 2006; 514—524.
14. Еришов Ф. И., Киселев О. И. Молекулярные основы действия интерферона на клетки / Интерфероны и их индукторы. М.: 2005; 64—69.
15. Еришов Ф. И., Киселев О. И. Ключевая роль неструктурного белка NS1 вирусов в подавлении индукции генов интерферона 1-го типа / Интерфероны и их индукторы. М.: 2005; 70—78.

16. Козлов В. А. Бюлл. СО РАМН 1998; 2: 16—19, 152, 156—157.
17. Rouse B. T., Horohov D. W. Immunosuppression in viral infections. *Rev Infect Dis* 1986; 6: 850—874.
18. Kawai T., Akira S. *J Biochem* 2007; 141: 137—145.
19. Kirsch M.I., Hulseweh B., Nacke C. *et al.* Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). *BMC Biotechnol* 2008; 8: 66—72.
20. Tao P., Luo M., Pan R. *et al.* Enhanced protective immunity against H5N1 influenza virus challenge by vaccination with DNA expressing a chimeric hemagglutinin in combination with an MHC class I-restricted epitope of nucleoprotein in mice. *Antiviral Res* 2009; 81: 3: 253—260.
21. Романцов М. Г. Интерферогены: перспективы клинического применения. — СПб.: 1998.
22. Еришов Ф. И., Чижов Н. П. Химиопрепараты против наиболее распространённых вирусных инфекций. *Materia Medica* 1996; 2: 15—27.
23. Kaisho H. *Nat Immunol* 2002; 3: 196—200.
24. Романцов М. Г., Горячева Л. Г., Коваленко А. Л. Противовирусные и иммуностропные препараты. СПб.: 2008; 44—57.
25. Генес В. С. Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований. М.: 1967; 208.

Эргоферон и Осельтамивир в лечении гриппа — результаты многоцентрового сравнительного рандомизированного клинического исследования

А. В. АВЕРЬЯНОВ¹, А. П. БАБКИН², Б. Я. БАРТ³, А. Л. ВОЛЧЕЦКИЙ⁸, Е. С. МИНИНА⁴, О. А. КОЗЫРЕВ⁵, М. П. КОСТИНОВ⁶, Д. В. ПЕТРОВ⁷, Е. П. СЕЛЬКОВА⁸, М. А. ПУТИЛОВСКИЙ⁹, В. Б. НЕЧАЕВ⁹, О. И. ЭПШТЕЙН⁹, Е. Н. АНДРИАНОВА⁹

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Москва

² ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра поликлинической терапии и общей врачебной практики, Воронеж

³ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра поликлинической терапии лечебного факультета с курсом повышения квалификации врачей первичного звена здравоохранения ФУВа, Москва

⁴ ФГБУ «Поликлиника № 3» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва

⁵ ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск

⁶ ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» РАМН, Москва

⁷ ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ярославль

⁸ ФГБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

⁹ ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг», Москва

Ergoferon and Oseltamivir in Treatment of Influenza: Results of Multicentre Randomized Comparative Clinical Trial

A. V. AVERYANOV, A. P. BABKIN, B. YA. BART, A. L. VOLCHETSKY, E. S. MININA, O. A. KOZYREV, M. P. KOSTINOV, D. V. PETROV, E. P. SELKOVA, M. A. PUTILOVSKY, V. B. NECHAEV, O. I. EPSTEIN, E. N. ANDRIANOVA

Federal Scientific and Clinical Centre of Specialized Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical and Biological Agency, Moscow
N.N.Burdenko Voronezh State Medical Academy, Voronezh

N.I.Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
Polyclinic No. 3, Moscow

Smolensk State Medical Academy, Smolensk

I.I.Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl

G.N.Gabrichesky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Materia Medica Holding, Moscow

Ограниченный выбор и резистентность вирусов к наиболее распространённым лекарственным средствам стимулируют поиск и внедрение в клиническую практику новых препаратов для лечения гриппа с доказанной эффективностью и безопасностью. Эргоферон — новый комбинированный препарат, созданный на основе релиз-активных антител к интерферону-γ (анти-IFNγ), CD4-корцептору и гистамину, обеспечивающий воздействие на различные звенья противовирусной защиты и противовоспалительный эффект. Эффективность препарата связана с технологией его производства, в процессе которого многократное уменьшение исходной концентрации каждого компонента приводит к высвобождению особой релиз-активности. В ходе ранее проведённых экспериментальных исследований была показана противовирусная эффективность анти-IFNγ в отношении пандемического вируса гриппа A(H1N1)2009, сопоставимая с осельтамивиром (подавление репликации вируса в лёгочной ткани, увеличение продолжительности жизни и снижение летальности лабораторных животных). Целью многоцентрового рандомизированного клинического исследования была сравнительная (с осельтамивиром) оценка эффективности и безопасности эргоферона в лечении гриппа у взрослых пациентов. В течение двух эпидемиологических сезонов (2010—11 и 2011—12) обследовано 213 больных из 8 медицинских центров РФ, обратившихся к врачу в первые 48 часов от начала заболевания с гриппоподобными симптомами (лихорадкой $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$, как минимум одним общим и одним респираторным симптомом). У 52 пациентов методом экспресс-диагностики QuickVue был подтвержден грипп. В

течение 5 дней 23 пациента получали эргоферон по лечебной схеме, 29 — осельтамивир (суточная доза 150 мг). Длительность наблюдения составила 7 дней. Первичным критерием эффективности был удельный вес больных с нормализацией температуры тела на 2—5 сутки лечения. Максимальная эффективность эргоферона проявлялась

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 127473, Москва, 3-й Самотёчный пер., 9.
ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг»

на вторые сутки лечения, когда почти половина (48%) исходно лихорадящих больных имела нормальную температуру тела (против 28% пациентов, получавших осельтамивир). Сравнение долей пациентов двух групп по утренним и вечерним измерениям температуры в каждый из пяти дней лечения по критерию Cochran-Mantel-Haenszel выявило значимое различие между группами эргоферона и осельтамивира ($\chi^2=7,1$; $p=0,008$). Средняя длительность лихорадки в группе эргоферона составила $2,3 \pm 1,2$ суток, в группе осельтамивира — $2,6 \pm 1,3$ суток (эффективность лечения осельтамивиром, полученная в ходе исследования, была не ниже опубликованных ранее результатов). Удельный вес больных, которым назначали жаропонижающие средства вследствие гипертермии, на второй день лечения эргофероном уменьшился в 3 раза и составил 17% (против 41% в группе осельтамивира). Тяжесть общесоматических и респираторных симптомов (со стороны носа/горла/грудной клетки) существенно снизилась на третьи сутки лечения в обеих группах, подавляющее число участников исследования либо имели минимальную степень выраженности симптомов гриппа, либо их не имели, что сочеталось с положительной динамикой качества жизни пациентов. В ходе исследования не было зарегистрировано ни одного случая ухудшения течения заболевания, не отмечено развития осложнений, требующих назначения антибиотиков или госпитализации; не было выявлено ни одного нежелательного явления, имеющего достоверную связь с приёмом исследуемого препарата, не зафиксировано отклонений лабораторных показателей. Эргоферон — новый безопасный препарат для лечения гриппа, по клинической эффективности сопоставимый с осельтамивиром. Эффект лечения заключается в снижении продолжительности лихорадочного периода, который у большинства пациентов ограничивается двумя сутками, а также степени тяжести и длительности течения общих и респираторных симптомов гриппа.

Ключевые слова: грипп, противовирусный препарат, лихорадка, эргоферон, релиз-активные антитела.

The narrow range of choice and virus resistance to the most common drugs require search and introduction of new drugs with proven efficacy and safety for the treatment of influenza. Ergoferon is a new combined medicine containing release active antibodies to interferon- γ (anti-IFN γ), CD4-coreceptor and histamine. The formulation influences various links of antiviral defense and provides antiinflammatory effect. The efficacy of the drug is related to its production process during which multiple reduction of the initial concentration of every component leads to release of special release activity. Previous experimental studies showed that anti-IFN γ had antiviral activity against pandemic influenza virus A (H1N1) 2009 comparable to that of oseltamivir (suppression of virus replication in the lung tissue, increase of the lifespan and reduction of the laboratory animals mortality). The aim of the multicentre randomized clinical trial was to compare (versus oseltamivir) the efficacy and safety of ergoferon in the treatment of influenza in adults. 213 patients with flu-like symptoms were examined in 8 medical centres of Russia during two epidemiological seasons (2010—11 and 2011—12). The inclusion criteria were: the first 48 hours after the onset; fever $\geq 37,8^\circ\text{C}$, at least one common symptom and at least one respiratory symptom. Influenza was confirmed in 52 patients by QuickVue rapid diagnosis. 23 patients received ergoferon according to the treatment scheme and 29 received oseltamivir (daily dose 150 mg). Duration of the treatment was 5 days. The patients were followed up for 7 days. The primary endpoint was the percentage of the patients with the body temperature normalization for 2—5 days of the treatment. The maximum efficacy of ergoferon was observed on the second day of the treatment: almost half (48%) of the initially febrile patients had normal body temperature (versus 28% in the patients treated with oseltamivir). The comparison of the two groups of the patients by the morning and evening measurements of the body temperature every five days of the treatment by Cochran-Mantel-Haenszel revealed a significant difference between the two groups ($\chi^2=7,1$; $p=0,008$). The average duration of the fever in the group of ergoferon was $2,3 \pm 1,2$ days, in the group of oseltamivir — $2,6 \pm 1,3$ days (the efficacy of oseltamivir in the present study was comparable with the previously published data). The percentage of the patients treated with antipyretics because of hyperthermia on the second day of the treatment lowered 3 times and amounted to 17% (versus 41% in the oseltamivir group). The severity of common and respiratory symptoms (nose/throat/chest) significantly decreased on the third day of the treatment in both groups, the majority of the patients had either minimum severity or no signs of influenza. The clinical improvement was associated with positive changes in the life quality. No cases of the disease aggravation were recorded. Complications requiring antibiotic treatment or hospitalization were not observed during the follow-up. There were no adverse events recorded due to the drug use. No deviations in the laboratory indices were stated. Ergoferon is a new safe drug for the treatment of influenza. Its clinical efficacy was comparable to that of oseltamivir. The therapeutic effects of the drug were evident from: significant reduction of the disease severity, duration of febricity and general toxicity and respiratory flu symptoms, lower percentage of the patients with fever for 2 days. The febrile period in most of the patients did not exceed 2 days.

Key words: influenza, antiviral drugs, fever, ergoferon, release active antibodies.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодные эпидемии гриппа приводят примерно к 3—5 миллионам случаев тяжёлой болезни и к 250 000—500 000 случаев смерти во всём мире [1]. Оказывая серьёзное воздействие на все возрастные группы населения, грипп негативно влияет на экономику и представляет чрезмерную нагрузку на службы здравоохранения. После сезонных эпидемий гриппа, как правило, отмечается подъём заболеваемости инсультами, инфарктами, сахарным диабетом и др. Большинство летальных исходов от гриппа и его

«последствий» в промышленно развитых странах происходит среди людей 65 лет и старше.

В настоящее время внедряются в практику Глобальная и региональные программы по гриппу, в рамках которых осуществляется мониторинг и диагностирование гриппа, принимаются ответные меры на вспышки болезни, проводятся профилактические мероприятия, в том числе, вакцинация, мониторинг чувствительности циркулирующих вирусов гриппа к противовирусным препаратам. В отличие от ВИЧ-инфекции, для лечения которой созданы более двух десятков лекарственных

средств различных классов, в терапии гриппа используются всего несколько препаратов двух классов — это адамантаны (амантадин и ремантадин, которые по опубликованным в 2012 г. данным ВОЗ неэффективны против всех циркулирующих в настоящее время вирусов), и ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир и занамивир) [2, 3]. Проблема заключается, прежде всего, в необходимом уровне безопасности, которым должны соответствовать противогриппозные средства. По словам вирусолога академика Н. В. Каверина, «чем тяжелее инфекция, тем большую токсичность можно допустить для препарата» [4]. При гриппе, напротив, должны применяться не токсичные и безопасные лекарственные средства. Другая сторона этой проблемы — лекарственная резистентность вирусов, которая ограничивает эффективность лечения гриппа. Данные факты стимулируют поиск, разработку и внедрение в клиническую практику новых эффективных и безопасных противовирусных лекарственных средств.

Безусловный интерес для многих специалистов представляют первые результаты многоцентрового исследования клинической эффективности и безопасности нового противовирусного препарата «Эргоферон», созданного компанией «НПФ «Материал Медика Холдинг» на основе релиз-активных антител к интерферону гамма (анти-IFN γ), CD4 (анти-CD4) и гистамину (анти-Н). Эффективность препарата связана с технологией его производства, в процессе которого происходит многократное уменьшение исходной концентрации каждого из компонентов, что приводит к высвобождению особой релиз-активности [5]. Комбинация активных компонентов эргоферона обеспечивает воздействие на различные звенья противовирусной защиты за счёт индукции эндогенного интерферона и влияния на его рецепторы, регуляции активности CD4+ клеток, в том числе антигенпрезентирующих (макрофагов и дендритных клеток) и Т-хелперов (Th1 и Th2), играющих ключевую роль в противовирусном иммунном ответе [6–10]. Неспецифическая противовирусная активность первых двух компонентов эргоферона дополнена эффектами анти-Н, влияющими на выраженность воспаления в респираторном тракте. Ниже представлены промежуточные результаты исследования, целью которого была сравнительная (с осельтамивиром) оценка эффективности и безопасности эргоферона в лечении гриппа.

Материал и методы

В течение двух эпидемиологических сезонов (2010–11 и 2011–12 гг.) в клиническое исследование (КИ), которое проводили в 8 медицинских центрах РФ, включались пациенты в возрасте от 18 до 60 лет с гриппом и гриппоподобными симптомами: температурой тела $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$, как минимум одним общим симптомом (озноб, слабость, головная боль, мышечная

боль, др.) и одним респираторным симптомом (назальная обструкция, боль в горле, кашель), обратившиеся к врачу в течение 48 часов от начала заболевания. После подписания информированного согласия на этапе скрининга пациентам проводилось начальное обследование (сбор анамнеза, оценка витальных функций, объективный осмотр, лабораторные исследования, экспресс-диагностика гриппа методом QuickVue), регистрировалась сопутствующая терапия. После известной пандемии 2009–10 заболеваемость гриппом в эти эпидсезоны была относительно невысокой. Из 213 больных с гриппоподобными симптомами только у 52 пациентов (средний возраст $32,0 \pm 14,5$ лет; 72% женщины) были подтверждены грипп.

Известно, что маркёром вирусемии в остром периоде гриппа, сопровождающемся общесиндромическим синдромом и симптомами поражения дыхательных путей, является повышенная температура тела, а критерием противовирусной эффективности лекарственного средства — её снижение/нормализация. В связи с этим в качестве первичного критерия клинической эффективности оценивалась доля пациентов с нормализацией температуры тела ($\leq 37,0^{\circ}\text{C}$) на 2–е–5–е сутки лечения эргофероном либо осельтамивиром. Вторичными критериями эффективности были выраженность и динамика клинических проявлений гриппа (лихорадка, общих симптомов со стороны носа/горла/грудной клетки), динамика частоты назначения жаропонижающих препаратов на 1–5 дни лечения, изменение качества жизни пациента, а также удельный вес больных, у которых отмечено ухудшение течения заболевания (развитие осложнений, требующих назначения антибиотиков или госпитализации).

Пациент не включался в КИ при подозрении/наличии инвазивной бактериальной инфекции или тяжёлого заболевания, требующего назначения антибактериальных препаратов, обострении или декомпенсации хронических заболеваний, поливалентной аллергии в анамнезе, беременности, кормлении грудью. Разрешался приём симптоматических препаратов, исходя из принятых стандартов лечения гриппа, включая жаропонижающие (по показаниям, при повышении температуры тела выше $38,5^{\circ}\text{C}$), отхаркивающие средства, муколитики, витамины, сосудосуживающие капли в нос, при необходимости проводилась дезинтоксикационная терапия.

После включения в КИ пациент рандомизировался в группу эргоферона ($n=23$) либо осельтамивира ($n=29$). Использовался метод блоковой рандомизации с размером блока 10. Эргоферон назначали по схеме: в первые сутки лечения — 8 таблеток (в первые 2 часа по 1 таблетке каждые 30 минут, затем, в оставшееся время, ещё 3 раза через равные промежутки), со 2-х по 5-е сутки препарат принимали 3 раза в день. Суточная доза осельтамивира составила 150 мг (по 75 мг 2 раза в день), длительность терапии — 5 дней.

В процессе лечения пациенты наносили врачу (либо врач — пациенту) 3 визита (на 1-й, 3-й и 7-й день), в ходе которых измерялась аксиллярная температура, регистрировались симптомы гриппа и сопутствующая терапия, оценивалась безопасность лечения. Для оценки эффективности терапии по первичному критерию учитывали значения утренней и вечерней температуры тела пациента, которую он регистрировал в течение всех дней наблюдения. Если пациенту назначали разрешённые к применению в ходе исследования жаропонижающие препараты вследствие сохранения у него гипертермии, принимали во внимание значения аксиллярной температуры до приёма антипиретика. Название и число приёмов лекарственных средств, которые пациенты принимали в качестве сопутствующей терапии, участники исследования фиксировали в дневнике. Степень выраженности симптомов интоксикации и катаральных симптомов оценивалась врачом в ходе визитов в баллах (симптом отсутствует — 0 баллов; слабо выражен — 1 балл; средневыражен — 2 балла; ярко выражен — 3 балла). В общей сложности пациент наблюдался в течение 7 суток (5 суток — лечение и 2 суток — наблюдение).

В настоящем клиническом исследовании, которое будет продолжено в следующем эпидсезоне 2012–2013, использует-

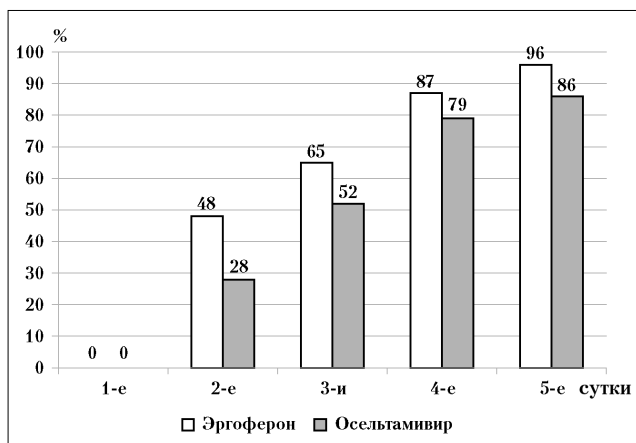


Рис. 1. Доли пациентов с нормализацией утренней температуры тела на 1-е, 2-е, 3-и, 4-е, 5-е сутки лечения.

Примечание. Здесь и на рис. 2. Частотный анализ с помощью критерия Cochran-Mantel-Haenszel показал достоверное превосходство результатов в группе Эргоферона ($\chi^2=7,1$; $p=0,008$).

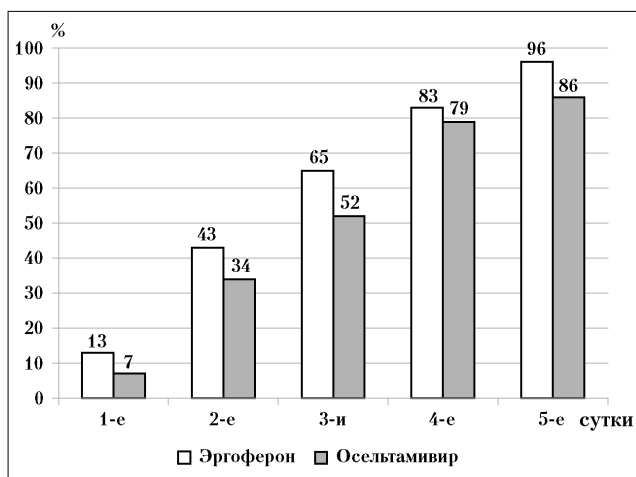


Рис. 2. Доли пациентов с нормализацией вечерней температуры тела на 1-е, 2-е, 3-и, 4-е, 5-е сутки лечения.

ся дизайн «Non Inferiority»(сопоставимости). В настоящей публикации, представляющей результаты предварительного анализа, использовался стандартный сравнительный статистический анализ. Статистическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета SAS-9.3¹. Для оценки различий непрерывных переменных, полученных в двух разных группах, использовался *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок с поправкой Бонферони для множественных сравнений; для оценки временной динамики сравниваемых показателей — дисперсионный анализ (ANOVA) в модификации с повторными измерениями (Repeated Measures). Частотный анализ долей пациентов из разных групп проводился с помощью точного критерия Фишера и критерия χ^2 (при множественных сравнениях использовалась модификация критерия χ^2 — критерий Cochran-Mantel-Haenszel).

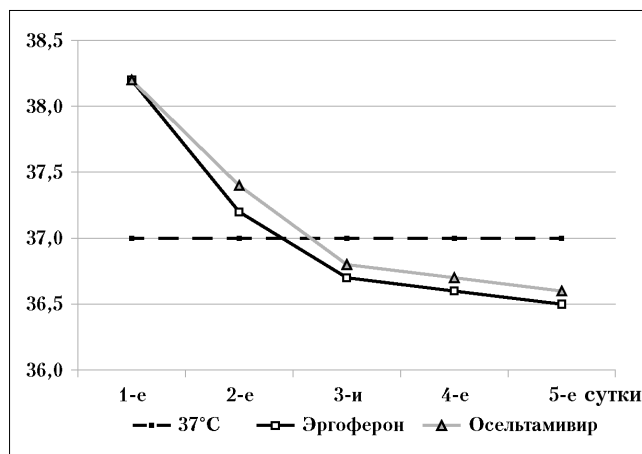


Рис. 3. Динамика утренней температуры тела на 1-е, 2-е, 3-и, 4-е, 5-е сутки лечения.

Примечание. Здесь и на рис. 4. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) не выявил достоверных различий между двумя группами.

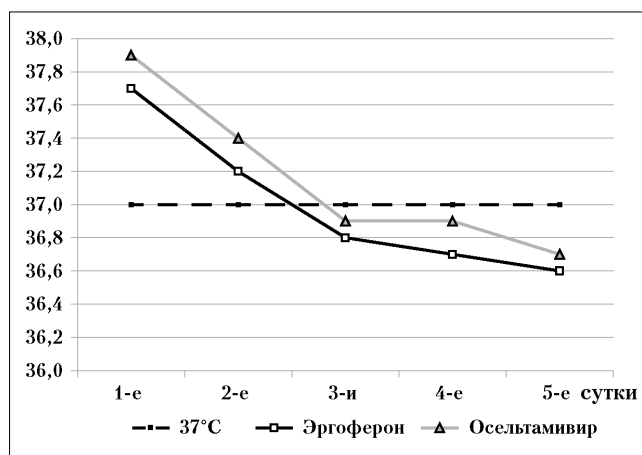


Рис. 4. Динамика вечерней температуры тела на 1-е, 2-е, 3-и, 4-е, 5-е сутки лечения.

Результаты исследования

Анализ температурной реакции показал, что эффективность эргоферона проявлялась, начиная с первых суток лечения, что подтверждалось превалированием пациентов с нормализацией температуры тела в группе активного препарата к вечеру первого дня наблюдения (13 против 7% в группе осельтамивира). Максимальная активность эргоферона регистрировалась, начиная со вторых суток (рис. 1, 2). Уже на утро второго дня почти половина (48%) исходно лихорадящих больных имели нормальную температуру тела (против 28% пациентов, получавших осельтами-

¹ Лицензиат: ООО «НПФ» Материя Медика Холдинг», №70100045.

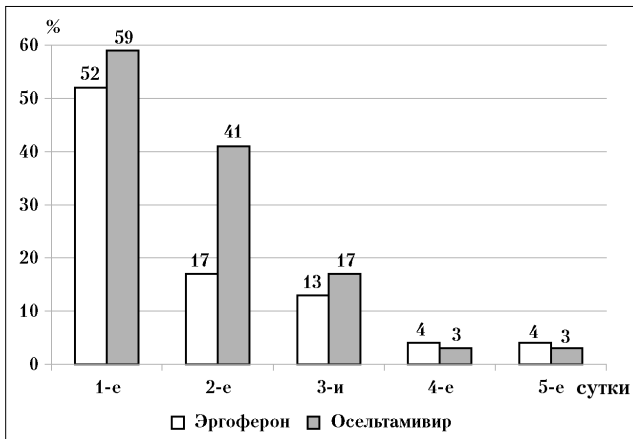


Рис. 5. Доли пациентов, принимавших жаропонижающие на 1-е, 2-е, 3-и, 4-е, 5-е сутки лечения.

Примечание. Сравнение долей пациентов в динамике 5 дней наблюдений не выявило достоверных различий между двумя группами (СМН: $\chi^2=2,0$; $p=0,153$). Различие на вторые сутки было близко к значимому: $\chi^2=3,5$; $p=0,063$.

вир). К вечеру второго дня это соотношение составило 43 и 34%, а на третьи сутки — 65 и 52% соответственно. Сравнение долей пациентов двух групп по утренним и вечерним измерениям температуры в каждый из пяти дней лечения по критерию Cochran-Mantel-Haenszel выявило значимое различие между группами эргоферона и осельтамивира на всём временном отрезке, включающем пять пар измерений ($\chi^2=7,1$; $p=0,008$).

Анализ средних значений утренней и вечерней термометрии и их динамики показал, что, начиная со вторых суток, температура тела от исходных $38,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в обеих группах существенно снижалась и, начиная с третьего дня, стабильно оставалась ниже $37,0^\circ\text{C}$ (рис. 3, 4). Средняя длительность лихорадки в группе эргоферона составила $2,3 \pm 1,2$ суток, в группе осельтамивира — $2,6 \pm 1,3$ суток.

Анализ результатов исследования по вторичным критериям подтвердил эффективность эргоферона, что выражалось в более низкой частоте приёма жаропонижающих средств в ходе лечения. В первый день терапии более половины пациентов обеих групп (52% в группе эргоферона и 59% в группе осельтамивира) получали антипиретики по поводу лихорадки, нарушавшей их самочувствие (рис. 5). На второй день лечения эргофероном удельный вес больных, принимавших жаропонижающие средства, снизился в 3 раза и составил 17% (против 41% в группе осельтамивира). По числу приёмов антипиретиков группы эргоферона и осельтамивира значительно различались в процессе лечения (рис. 6). Начиная с третьих суток, процент пациентов, которым требовалось назначение антипиретиков, был низким в обеих группах. Таким обра-

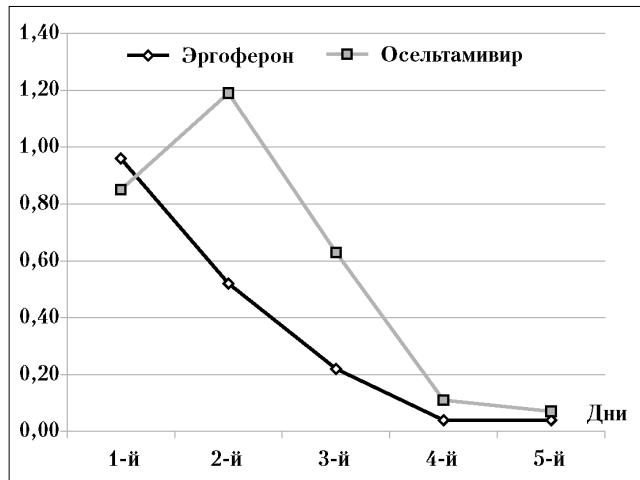


Рис. 6. Динамика числа приёмов жаропонижающих препаратов в процессе лечения.

Примечание. Дисперсионный анализ (ANOVA) показал, что в группе эргоферона числе приёмов жаропонижающих препаратов было значимо ниже (фактор ПРЕПАРАТ: $F_{1/48}=2,8$; $p=0,099$; фактор ДЕНЬ ЛЕЧЕНИЯ: $F_{4/192}=23,7$; $p<0,0001$; взаимодействие факторов ПРЕПАРАТ*ДЕНЬ ЛЕЧЕНИЯ: $F_{4/192}=3,6$; $p=0,018$).

зом, лечение эргофероном было наиболее полезно больным гриппом в первые двое суток, когда все симптомы заболевания максимально выражены. Эффект препарата заключался в значимом влиянии на основное проявление вирусной инфекции — лихорадку, которая вследствие эффективности лечения существенно и быстро снижалась, облегчая самочувствие больных.

Анализ вторичных критериев эффективности позволил продемонстрировать влияние эргоферона на клинические симптомы гриппа. Исходно проявления интоксикации, включая головную боль, озноб, слабость, мышечную и суставную боль, были выражены практически у 100% больных обеих групп, назальные симптомы (заложенность носа, чихание) — у 93% пациентов группы эргоферона и у 90% больных группы осельтамивира, боль в горле — у 83 и 79%, кашель — у 90 и 85% соответственно. Начальная тяжесть симптомов гриппа по данным объективного осмотра врача представлена в табл. 1. Наиболее выраженными (от умеренной степени до тяжёлой у большинства больных обеих групп) были типичные для гриппа симптомы головной боли, астении, а также боль в горле и мышечная боль. Обе группы в дебюте исследования не различались по частоте (табл. 2) и тяжести симптоматики.

Уже на третьи сутки лечения тяжесть общеинтоксикационного синдрома и респираторных симптомов существенно снизилась в обеих группах, подавляющее число пациентов имели либо минимальную степень выраженности, либо вообще не имели основных проявлений гриппа. Таким образом, в течение трёхдневного лечения у большинства больных с помощью эргоферона, так же

Таблица 1. Динамика выраженности общесоматических и респираторных симптомов гриппа в баллах на 1-е, 3-и и 7-е сутки наблюдения у пациентов обеих групп

Симптом	1-е сутки		3-и сутки		7-и сутки	
	эргоферон (n=23)	осельтамивир (n=29)	эргоферон (n=23)	осельтамивир (n=29)	эргоферон (n=23)	осельтамивир (n=29)
Головная боль	2,1±0,8	2,7±0,7	1,0±0,9	1,0±0,8	0,0±0,2	0,2±0,6
Озноб	1,9±1,1	2,2±1,0	0,3±0,5	0,3±0,7	0,0±0,0	0,0±0,0
Слабость	2,5±0,6	2,7±0,7	1,7±1,0	1,5±1,0	0,5±0,7	0,5±0,7
Боль в мышцах	1,8±1,1	2,1±1,0	0,5±0,7	0,3±0,6	0,0±0,2	0,0±0,0
Боль в суставах	1,5±1,2	1,7±1,2	0,5±0,7	0,3±0,5	0,0±0,2	0,0±0,2
Боль в глазных яблоках	1,4±1,1	1,5±1,2	0,3±0,8	0,2±0,5	0,0±0,2	0,0±0,0
Сонливость	1,6±1,0	1,7±1,2	1,0±0,8	0,9±1,0	0,4±0,6	0,2±0,5
Назальные симптомы	1,5±1,1	1,4±1,3	1,2±0,9	1,0±1,0	0,5±0,8	0,4±0,7
Чихание	1,2±1,0	1,3±1,1	0,6±0,8	0,6±0,8	0,2±0,5	0,1±0,4
Боль в горле	1,8±1,0	1,7±1,0	0,8±0,7	0,8±0,9	0,0±0,2	0,0±0,3
Кашель	1,7±1,1	1,2±1,0	1,4±1,0	1,1±1,2	0,5±0,7	0,5±0,8

Таблица 2. Доли пациентов (в %), у которых клинические проявления гриппа купировались на 3-и и 7-е сутки наблюдения

Симптом	3-и сутки		7-е сутки		СМН
	эргоферон (n=23)	осельтамивир (n=29)	эргоферон (n=23)	осельтамивир (n=29)	
Головная боль	58	71	100	93	$\chi^2=3,8$; $p=0,052$
Озноб	96	93	100	100	$\chi^2=0,9$; $p=0,352$
Слабость	42	46	96	89	$\chi^2=0,0$; $p=0,839$
Боль в мышцах	88	96	100	100	$\chi^2=0,0$; $p=0,839$
Боль в суставах	88	96	100	100	$\chi^2=0,1$; $p=0,809$
Боль в глазных яблоках	92	96	100	100	$\chi^2=0,0$; $p=0,939$
Сонливость	63	75	96	96	$\chi^2=0,2$; $p=0,698$
Назальные симптомы	71	71	100	96	$\chi^2=0,1$; $p=0,77$
Чихание	88	79	96	100	$\chi^2=0,1$; $p=0,741$
Боль в горле	83	82	100	100	$\chi^2=0,2$; $p=0,657$
Кашель	46	38	96	86	$\chi^2=0,1$; $p=0,787$

Таблица 3. Изменение суммарного балла опросника качества жизни в процессе лечения

Группа	День 1	День 7	Δ День 7 — День 1
Эргоферон (n=23)	9,3±2,2	5,4±1,2	-3,9±1,9
Осельтамивир (n=29)	9,1±2,8	5,4±0,9	-3,8±2,6

Примечание. Сравнение дельт по критерию Стьюдента не выявило достоверных различий между группами.

как и осельтамивира, удалось справиться с гриппозной инфекцией, что проявлялось в значительном улучшении (практическом отсутствии) клинической симптоматики. Следует отметить, что эффективность лечения осельтамивиром, полученная в нашем исследовании, была не хуже результатов, достигнутых в ходе ранее проведённых клинических исследований его эффективности и опубликованных в различных источниках [11—13]. На 7-е сутки наблюдения почти все 100% участников исследования были здоровы.

Улучшение клинической симптоматики сочеталось с положительной динамикой качества жизни пациентов, которую оценивали по данным опросника EQ5D (EUROQUAL; колебания от 15 до 5). Средний суммарный балл качества жизни у пациентов исследуемых групп был сопоставим исходно и в процессе наблюдения, отражая улучшение самочувствия пациентов по мере выздоровления от гриппа (табл. 3).

Наконец, анализ результатов лечения и наблюдения показал, что и в группе эргоферона, и в группе осельтамивира не было зарегистрировано ни одного случая ухудшения течения заболевания, в том числе ни у одного пациента не отмечено развития осложнений, требующих назначения антибиотиков или госпитализации.

В течение всего периода наблюдения не было выявлено ни одного нежелательного явления, имеющего достоверную связь с приёмом исследуемых препаратов. Эргоферон не оказывал отрицательного влияния на витальные функции и физикальные данные. Лабораторный мониторинг биохимических маркёров, анализов крови и мочи показал, что применение эргоферона по лечебной схеме в течение 5 дней не приводило к каким-либо отклонениям от нормальных значений. В ходе исследования не было получено данных о взаимодействии эргоферона с другими препаратами, прини-

мавшимися пациентами в качестве сопутствующей терапии.

Обсуждение результатов

Результаты исследования свидетельствуют об эффективности и безопасности эргоферона в лечении гриппа. Приём препарата у большинства пациентов с давностью заболевания не более 48 часов приводил к нормализации повышенной температуры тела в первые двое суток от начала терапии. Клиническая эффективность эргоферона по результатам оценки температурной реакции была сопоставима с результатами применения осельтамивира. Более того, частотный анализ удельного веса пациентов с нормализацией температуры тела в процессе лечения в зависимости от вида терапии показал значимое превосходство эргоферона.

Эффект лечения проявлялся с первого дня, а к исходу третьих суток подавляющее большинство больных гриппом имели нормальную температуру тела. Приём эргоферона оказался максимально полезным для пациентов именно в первые два дня лечения, что проявлялось в сокращении продолжительности лихорадки и отсутствии необходимости назначения жаропонижающих препаратов. Длительность лихорадочного периода у пациентов, принимавших эргоферон, была сопоставимой с продолжительностью лихорадки у пациентов, получавших специфическую противогриппозную терапию осельтамивиром, а частота приёма жаропонижающих препаратов была даже ниже, чем в сравниваемой группе. Кроме того, эргоферон, также как и осельтамивир, приводил к быстрому купированию всех основных общеинтоксикационных симптомов, а также респираторных проявлений со стороны носа/горла/грудной клетки, что в итоге улучшало качество жизни пациентов. Результаты клинического исследования позволяют сделать заключение об эффективности эргоферона в лечении гриппа за счёт противовирусного действия препарата и оптимального влияния на разные звенья противовирусной защиты, включая систему интерферонов, антигенпрезентирующие и Th клетки.

Данные, полученные в ходе настоящего клинического исследования, согласуются с результатами ранее проведённых и опубликованных экспериментальных исследований [7, 14], доказывающих противовирусную эффективность анти-IFN γ (первого компонента эргоферона), связанную, очевидно, с супрессией ядерного фактора κ B (NF- κ B) — ключевого фактора в реализации гриппозной инфекции [14]. Показано, что применение анти-IFN γ у заражённых LD₅₀ вируса гриппа A(H1N1)2009 лабораторных животных приводило к подавлению репликации вируса в лёгочной ткани (снижению титра вируса гриппа), увеличению продолжительности жизни и снижению летальности. Противо-

вирусная активность анти-IFN γ в отношении пандемического вируса гриппа A(H1N1)2009 была сопоставима с осельтамивиром, а при совместном применении двух препаратов значимо повышалась эффективность терапии [7]. Экспериментальные исследования на модели гриппа А (А/Н3N8 и 2 штамма А/Н1N1), проведённые в компании APCis S. A. (Франция) в сотрудничестве с Институтом Пастера (Франция), также показали противовирусную эффективность анти-IFN γ , сопоставимую с эффективностью осельтамивира (данные готовятся к публикации).

Кроме того, в ходе клинических и экспериментальных исследований доказано, что анти-IFN γ повышает экспрессию IFN- γ , IFN- α/β и сопряжённых с ними интерлейкинов (IL-2, IL-4, IL-10 и др.), улучшает лиганд-рецепторное взаимодействие IFN, нормализует концентрацию и функциональную активность естественных антител к IFN- γ , что обуславливает эффективную противовирусную защиту, а также оказывает протективное влияние на эпителий респираторного тракта и снижает выраженность воспаления [16].

Молекулярной мишенью анти-CD4 (второго компонента эргоферона) является CD4-корцептор Т-клеточного рецептора, представленный на Т-хелперах, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках. Известно, что различные факторы могут оказывать негативное воздействие на презентацию вирусного антигена CD4+ клетками, что в итоге снижает эффективность противовирусного ответа. Модулирующее влияние анти-CD4 на функциональную активность CD4+ клеток, обеспечивая «полноценную» презентацию антигена, эффективно противодействует вирулентной гриппозной инфекции, начиная с самых ранних этапов её развития. Кроме того, повышая функциональную активность CD4+ Т-лимфоцитов, анти-CD4 препятствует репликации вируса и способствует высокой скорости его клиренса [9, 10, 17]. Таким образом, совместное применение двух компонентов эргоферона (анти-IFN γ +анти-CD4) приводит к подавлению репликации вируса и формированию адекватного противовирусного ответа, что реализуется в быстром купировании лихорадки — основного клинического маркера вирусемии при гриппе, а также других клинических симптомов. Противовирусная и противовоспалительная эффективность анти-IFN γ +анти-CD4 дополняется влиянием анти-Н на гистамин-опосредованные механизмы инфекционного воспаления, что проявляется в активном разрешении респираторных симптомов вирусной инфекции.

Лечение эргофероном предупреждало развитие бактериальных осложнений, требующих применения антибиотиков. В ходе исследования был подтверждён высокий уровень безопасности препарата; не было получено данных о взаимодей-

вии эргоферона с лекарственными средствами, которые пациенты получали в качестве сопутствующей терапии.

Заключение

Таким образом, результаты исследования показали эффективность эргоферона в лечении гриппа у взрослых пациентов при назначении его по лечебной схеме в течение пяти дней. Действие препарата проявляется быстрой нормализацией повышенной температуры тела у большинства пациентов уже на вторые сутки. Эргоферон значительно снижает необходимость назначения жаропонижающих средств, начиная с первого дня ле-

чения. Приём эргоферона эффективно влияет на степень тяжести и длительность течения общин-токсикационных и респираторных симптомов гриппа. Наши данные свидетельствуют, что по клинической эффективности эргоферон сопоставим с осельтамивиром. Авторы отдают себе отчёт в том, что исследование имеет определённые ограничения, прежде всего по объёму выборки, чтобы делать окончательные выводы. Тем не менее, будучи выполненной по принципам медицины, основанной на доказательствах, данная работа может претендовать на начало нового направления в такой важной области, как лечение гриппозной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.who.int/influenza/>
2. Antiviral Agents for the Treatment and Chemoprophylaxis of Influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) // Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta. Recommendations and Reports. 2011; 60: 1.
3. Influenza Antiviral Medications: A Summary for Clinicians, 2011–2012 // Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta / August 30, 2011.
4. Каверин Н. В. Пандемии гриппа в истории человечества: <http://polit.ru/article/2011/02/07/pandemia/>
5. Энштейн О. И. Релиз-активность — от феномена до создания новых лекарственных средств. Бюлл экспер биол мед 2012; 157: 7: 62–67.
6. Tarasov S., Dugina Y., Sergeeva S., Epstein O. Oral antibody to interferon gamma in ultra low doses: clinical efficacy and interferon stimulation in patients with upper respiratory viral infections. *Fundament Clin Pharmacol* 2008; 22: 2: 37–37.
7. Tarasov S. A., Zarubaev V. V., Gorbunov E. A. Activity of ultra-low doses of antibodies to gamma-interferon against lethal influenza A(H1N1)2009 virus infection in mice. *Antiviral Res* 2012; 93 (2): 219–224.
8. Vasil'ev A. N., Sergeeva S. A., Kachanova M. V. Use of ultralow doses of antibodies to gamma-interferon in the treatment and prophylaxis of viral infections. *Antibiot khimioter* 2008; 53: 32–35.
9. Baccam P., Beauchemin C., Macken C. A., Hayden F. G., Perelson A. S. Kinetics of influenza A virus infection in humans. *J Virol* 2006; 80: 7590–7599.
10. Ha Youn Lee, David J. Topham, Sung Yong Park et al. Simulation and prediction of the adaptive immune response to influenza A virus infection. *J Virology Inlu* 2009; 7151–7165.
11. Dutkowski R. Oseltamivir in seasonal influenza: cumulative experience in low- and high-risk patients. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2: ii11–24.
12. Jefferson T., Demicheli V., Deeks J., Rivetti D. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; 2: CD001265.
13. Jefferson T., Jones M., Doshi P. et al. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: a Cochrane review. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 Feb 17; 2: CD001265.
14. Shishkina L. N., Skarnovich M. O., Kabanov A. S. et al. Antiviral activity of anaféron (pediatric formulation) in mice infected with pandemic influenza virus A(H1N1/09). *Bull Exp Biol Med* 2010; 149, 612–614.
15. Ludwig S. Targeting cell signalling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1: 1–4.
16. Sanders C. J., Doherty P. C., Thomas P. G. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 13–21.
17. To K., Hung I. F., Li I. W. et al. Delayed clearance of viral load, marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 850–859.

Гепатопротекторная терапия ремаксолом у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией в дневном стационаре противотуберкулёзного диспансера

Е. В. ШЕВЫРЕВА¹, А. К. ИВАНОВ², Д. С. СУХАНОВ¹, А. А. МУРЗИНА¹

¹ ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

² ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии

Remaxol Hepatoprotective Therapy of Patients with Tuberculosis and HIV Infection in Day Unit of Tuberculosis Dispensary

E. V. SHEVYREVA, A. K. IVANOV, D. S. SUKHANOV, A. A. MURZINA

I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg

St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg

С целью совершенствования терапии гепатотоксических реакций при проведении противотуберкулёзной полихимиотерапии проведена оценка влияния препарата Ремаксол на биохимические показатели и параметры антиоксидантной системы у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией. Использование препарата ремаксол, обладающего цитопротективным, антихолестатическим, антигипоксическим и антиоксидантным эффектами, у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией с лекарственными поражениями печени на фоне полихимиотерапии туберкулёза, значительно улучшает биохимические показатели, уменьшая выраженность цитолитического и холестатического синдромов. Применение ремаксола повышает потенциал антиоксидантной системы и оказывает антигипоксическое действие.

Ключевые слова: туберкулёз, ВИЧ-инфекция, лекарственные поражения печени, терапия, ремаксол.

To improve the treatment of hepatotoxic responses to antituberculosis polychemotherapy, the impact of remaxol on the biochemical indices and parameters of the antioxidant system in patients with tuberculosis and HIV infection was estimated. The use of remaxol having cytoprotective, anticholestatic, antihypoxic and antioxidant effects in the treatment of patients with tuberculosis and HIV infection and liver drug damage due to tuberculosis polychemotherapy significantly improved the biochemical indices and lowered the level of the cytolytic and cholestatic syndromes. Remaxol increased the antioxidant system potential and had an antihypoxic effect.

Key words: tuberculosis, HIV infection, liver drug damage, therapy, remaxol.

Туберкулёз является одним из наиболее распространённых вторичных заболеваний при ВИЧ-инфекции. По данным аналитического обзора статистических показателей по туберкулёзу в РФ (2010 г.), число новых случаев сочетания туберкулёза и ВИЧ-инфекции с 2004 по 2010 год увеличилось в 7,5 раз [1].

Наиболее частым сопутствующим заболеванием у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией является хронический вирусный гепатит (ХВГ) (до 80%), что связано с общими путями передачи ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов [2]. Абсолютное большинство пациентов, страдающих хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) —

потребители инъекционных наркотических препаратов [3].

Необходимость длительного применения полихимиотерапии в лечении туберкулёза создаёт высокую медикаментозную нагрузку на гепатоциты, осуществляющие метаболизм лекарственных препаратов. Это обуславливает развитие лекарственных поражений печени и гепатобилиарной системы, частота которых колеблется от 5 до 72% [4]. Сочетание таких факторов, как поражение печени вирусами гепатитов и ВИЧ, а также наркотическими препаратами и алкоголем, затрудняет лечение туберкулёза, снижает его эффективность и требует применения фармакологических средств, корректирующих и предупреждающих гепатотоксическое действие противотуберкулёзных препаратов.

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47. СЗГМУ им. И. И. Мечникова

Общий механизм развития повреждений печени [5] позволяет использовать в качестве корректирующих средств субстратные антигипоксанты, включающие препараты янтарной кислоты, одним из которых является ремаксол. Эффективность применения ремаксола изучена в комплексном лечении больных туберкулёзом [6], хроническими вирусными гепатитами [7, 8], респираторным дистресс-синдромом и острым панкреатитом [9, 10], механической желтухой [11].

Нами проведена оценка гепатопротекторной эффективности сукцинатсодержащего раствора «Ремаксол» у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией с лекарственными поражениями печени (ЛПП) на фоне полихимиотерапии туберкулёза органов дыхания.

Материал и методы

Исследование выполнено на базе дневного стационара противотуберкулёзного диспансера. В исследование включен 71 пациент с туберкулёзом органов дыхания и ВИЧ-инфекцией (в стадии 4Б и 4В). Критериями включения в исследование являлись: возраст от 18 до 60 лет, уровень CD4+ более 200 кл/мл, отсутствие тяжёлых сопутствующих хронических заболеваний в стадии суб- и декомпенсации (в т. ч. цирротической стадии хронического гепатита), повышение активности АлАТ в 1,5 раза и более по сравнению с верхней границей нормальных значений.

Больные туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией были разделены на две подгруппы: первую подгруппу (ПГ1) составили 38 больных, у которых в качестве гепатопротекторного препарата использовали ремаксол. Вторую подгруппу (ПГ2), которая являлась группой сравнения, составили 33 пациента, получавших терапию 5% раствором глюкозы. Ремаксол больным ПГ1 вводили внутривенно капельно по 400 мл один раз в день в течение 10 дней. В ПГ2 5% раствор глюкозы (400 мл) вводился также один раз в течение 10 дней. На период проведения исследования больным были отменены другие гепатопротекторы и препараты, обладающие антиоксидантными свойствами (такие как аскорбиновая кислота, токоферола ацетат и др.). При повышении активности АлАТ до 5 норм противотуберкулёзная терапия сохранялась в полном объёме, при превышении более 5 норм противотуберкулёзные препараты отменялись.

Важно отметить, что среди всех обследованных пациентов в 92,9% случаев (у 66 человек) в крови были выявлены маркёры вирусных гепатитов С (ХВГС) и В (ХВГВ). Наиболее часто регистрировали маркёры вирусного гепатита С — в 27 (71,1%) случаях у больных в ПГ1 и в 24 (72,7%) случаях у больных в ПГ2.

Рутинное биохимическое обследование подразумевало оценку параметров аланиламинотрансферазы (АлАТ), общего билирубина, щелочной фосфатазы (ЩФ) и γ -глутамилтрансферазы (ГГТ) на автоматическом анализаторе. Определение уровня эндогенного оксида азота по его ближайшему метаболиту — нитриту сыворотки крови, а также показателей антиоксидантной системы: общего антиоксидантного статуса (ОАСт), общей антиоксидантной способности (ОАСп) и активности глутатион-S-трансферазы (GST) проводилось на фотометре Bio-Rad Model 680 с помощью тест-систем. Исследование биохимических показателей и оценка показателей антиоксидантной системы у больных ПГ1 и ПГ2 проводилось двукратно — исходно и по окончании курса лечения.

Статистическую обработку результатов исследования проводили параметрическими и непараметрическими мето-

дами вариационной статистики с вычислением средней арифметической выборочной совокупности (M) и ошибки средней арифметической (m).

Сравнение средних значений полученных показателей проводилось до и после лечения (P₁) как в ПГ1, так и в ПГ2, а также между подгруппами после применения ремаксола и глюкозы (P₂). Кроме этого, сравнение биохимических показателей проводилось в зависимости от присутствия у больных маркёров ХВГС или ХВГС+ХВГВ (P₃) и изменение этих показателей после проведения лечения гепатопротекторами (P₄). Также проведено сравнение биохимических показателей крови у больных, которые помимо противотуберкулёзной терапии, получали АРВТ (P₅), и их изменение после проведения гепатопротекторной терапии (P₆). При этом уровень достоверных различий в $p < 0,05$ фиксировали как «*», а уровень различий в $p < 0,001$ как «**».

Результаты и обсуждение

Для установления природы поражения печени (вирусное или токсическое) у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией, получающих противотуберкулёзную терапию, нами выполнено определение уровня оксида азота по содержанию его ближайшего метаболита — нитрита сыворотки крови [12].

Средний уровень нитрита сыворотки крови больных составил $40,89 \pm 3,06$ мкмоль/л, и превышал уровень этого показателя у практически здоровых лиц ($8,09 \pm 1,13$ мкмоль/л, по данным литературы), что свидетельствовало в пользу токсического, а не вирусного поражения печени.

У больных, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, уровень нитрита сыворотки крови составил $65,68 \pm 10,58$ мкмоль/л и был на 52% выше, чем у больных с ХВГС ($31,49 \pm 3,51$ мкмоль/л, $p < 0,001$), и на 36% выше, чем у больных с ХВГС+В ($42,14 \pm 7,52$ мкмоль/л, $p < 0,05$). У больных с ХВГС и ХВГС+В уровень нитрита сыворотки крови достоверно не различался.

Уровень нитрита сыворотки крови у больных, которые, кроме противотуберкулёзной терапии, получали антиретровирусную терапию (АРВТ), оказался на 12% выше, чем у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию — $45,65 \pm 10,89$ и $40,23 \pm 3,53$ мкмоль/л соответственно.

Таким образом, средний уровень нитрита сыворотки крови у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией был высоким, что, по данным литературы, свидетельствует в пользу преимущественно токсического, а не вирусного поражения печени.

У больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, уровень нитрита сыворотки крови оказался выше, чем у больных с ХВГС и больных с ХВГС+В.

Средний уровень билирубина в крови больных ПГ1 и ПГ2 находился в пределах лабораторной нормы как до начала лечения ($10,18 \pm 0,96$ и $11,91 \pm 1,51$ мкмоль/л соответственно), так и после ($10,78 \pm 1,51$ и $12,3 \pm 1,13$ мкмоль/л соответственно) него.

При этом в ПГ1 у 41,6% больных показатель уровня билирубина снизился, у 55,6% повысился, у 2,8% не изменился. В ПГ2 снижение показателя отмечено у 31,6%, а у 68,4% он повысился. Индивидуальная динамика показателя уровня билирубина в ПГ1 и ПГ2 составила +0,41 и +1,5 мкмоль/л соответственно.

В то же время у больных ПГ1 с ХВГС уровень билирубина в крови оказался несколько выше (на 16%), чем у больных с ХВГС+В. У больных ПГ2 с ХВГС уровень билирубина в крови был на одну треть выше, чем у больных с ХВГС+В ($14,5 \pm 2,77$ и $10,1 \pm 2,46$ мкмоль/л соответственно).

Несмотря на применение ремаксола у больных ПГ1 с ХВГС уровень билирубина повысился на 3,5%. У больных с двумя ВГ уровень билирубина увеличился на 9%.

В то же время в ПГ2 после терапии раствором глюкозы у больных с ХВГС уровень билирубина снизился на 11%, а у больных с ХВГС+В было отмечено даже увеличение уровня билирубина на 20%.

Уровень билирубина у больных, получающих АРВТ, оказался на 23% ниже, чем у больных, получавших только противотуберкулёзную терапию.

На фоне гепатопротекторной терапии у больных, получающих АРВТ, уровень билирубина крови не изменился, в то время как у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию, уровень билирубина даже повысился на 3,5% и после лечения оказался достоверно выше, чем у больных, получающих АРВТ ($p < 0,05$).

Таким образом, в обеих группах уровень билирубина крови изначально был практически одинаков и не имел существенных различий после лечения ремаксолом и глюкозой, как в группах больных, так и между группами.

Интересен факт, что уровень билирубина у больных с ХВГС в обеих подгруппах был выше, чем у больных с ХВГС+В, но на фоне лечения снижение уровня билирубина отмечено только у больных с ХВГС, у которых применялась глюкоза.

При этом уровень билирубина у больных, получающих АРВТ, оказался ниже, чем у больных, получавших только противотуберкулёзную терапию, и не менялся при проведении гепатопротективной терапии.

На фоне применения ремаксола у больных ПГ1 произошло достоверное снижение исходно высокого уровня активности АлАТ ($p < 0,05$), при этом у 75,0% больных показатель снизился, у 22,2% — повысился, у 2,8% — остался без динамики. В то же время у больных ПГ2 показатель снизился только на 25% и не имел достоверных различий. В ПГ2 снижение активности АлАТ было отмечено у 57,9% больных, а у 42,1% она повысилась. Тем не менее в обеих подгруппах уровень АлАТ оставался выше нормы (в 1,4 и 1,5 раза соответственно).

Индивидуальная динамика снижения показателя активности АлАТ в ПГ1 и ПГ2 составила -30,4 и -19,5 Ед/л соответственно.

У больных ПГ1 с ХВГС уровень АлАТ был на 33% выше, чем у больных с ХВГС+В, и составил $115,3 \pm 15,6$ и $77,8 \pm 4,5$ Ед/л соответственно ($p < 0,05$).

На фоне применения ремаксола у больных с ХВГС уровень активности АлАТ снизился на 47% ($p < 0,05$), а у больных с ХВГС+В только на 5%.

У больных ПГ1, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, уровень АлАТ составил $127,0 \pm 57,7$ Ед/л и был даже на 9% выше, чем у больных с ХВГС, и на 39% выше, чем у больных с ХВГС+В.

После терапии раствором глюкозы у больных ПГ2 с ХВГС уровень АлАТ снизился на 31%, а у больных с ХВГС+В уровень АлАТ даже увеличился на 45% ($123,65 \pm 31,42$ Ед/л).

У больных ПГ2, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, уровень АлАТ составил $101,2 \pm 55,39$ Ед/л и был на 2% выше, чем у пациентов с ХВГС, и на 33% выше, чем у пациентов с ХВГС+В.

При изучении влияния антиретровирусной терапии на уровень АлАТ у больных, которые помимо противотуберкулёзной терапии получали АРВТ, оказалось, что он был исходно на 10% выше, чем у больных, получавших только противотуберкулёзную терапию, и составил $115,9 \pm 22,62$ и $105,4 \pm 14,0$ Ед/л соответственно.

Важно отметить, что на фоне гепатопротекторной терапии у больных, получающих АРВТ, показатель АлАТ снизился лишь на 6% ($108,5 \pm 31,39$ Ед/л), в то время как у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию, показатель АлАТ снизился на одну треть до $69,5 \pm 6,2$ Ед/л ($p < 0,05$).

Таким образом, на фоне применения ремаксола у больных ПГ1 произошло достоверное снижение показателя АлАТ, в то время как у больных ПГ2 показатель АлАТ снизился лишь на четверть и достоверных различий не имел.

Уровень активности АлАТ у больных с ХВГС оказался выше, чем у больных с ХВГС+В. В то же время самый высокий уровень активности АлАТ был у больных без вирусных гепатитов. На фоне лечения ремаксолом отмечено достоверное снижение показателя активности АлАТ у больных с ХВГС, а у больных с ХВГС+В этот показатель снизился лишь на 5%. У больных ПГ2 с ХВГС на фоне терапии раствором глюкозы уровень активности АлАТ снизился на треть, однако достоверных различий не имел, при этом у больных с ХВГС+В уровень АлАТ даже увеличился на 45%.

У больных, получающих одновременно противотуберкулёзную и антиретровирусную терапию, уровень активности АлАТ оказался на 10% выше, чем у больных, которым проводилась толь-

ко противотуберкулёзная терапия. Гепатопротекторная терапия оказалась наиболее эффективной у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию.

Исходные значения коэффициента де Ритиса у обследованных больных составили $0,84 \pm 0,077$ и $0,93 \pm 0,066$ в ПГ1 и ПГ2 соответственно. По окончании терапии у 75% больных ПГ1 показатель повысился в 1,7 раза ($1,46 \pm 0,16$, $p < 0,001$), в то время как у больных ПГ2 он повысился только у 47,4% больных и составил $0,96 \pm 0,097$.

Показатель активности ЩФ у больных ПГ1 и ПГ2 до начала лечения составил $98,22 \pm 19,75$ и $123,3 \pm 13,23$ Ед/л соответственно и не имел достоверных различий между этими группами.

На фоне применения ремаксола произошло снижение активности ЩФ на 15%. В ПГ2 на фоне терапии раствором глюкозы показатель активности ЩФ достоверно снизился ($p < 0,05$).

В ПГ1 снижение показателя активности ЩФ отмечено у 55,6% больных, а повышение — у 44,4%. В то же время в ПГ2 показатель активности ЩФ снизился у 42,1% больных, а у 57,9% — повысился. Индивидуальная динамика снижения показателя активности ЩФ в ПГ1 и ПГ2 составила $-0,24$ и $-0,9$ Ед/л соответственно.

В ПГ1 до начала терапии ремаксолом у больных с ХВГС показатель активности ЩФ был на 17% выше, чем у больных с ХВГС+В — $106,0 \pm 26,5$ и $88,2 \pm 20,4$ Ед/л соответственно. По окончании курса ремаксола у больных с ХВГС показатель активности ЩФ снизился на 14%, в то время как у больных с ХВГС+В он увеличился на 5%.

У больных ПГ1, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, показатель активности ЩФ находился в пределах лабораторной нормы — $67,0 \pm 18,28$ Ед/л и был на 37% ниже, чем у больных с ХВГС, и на 24% ниже, чем у больных с ХВГС+В. После курса ремаксола показатель активности ЩФ у этих больных снизился также на 15%.

В ПГ2 у больных с ХВГС показатель активности ЩФ был выше, чем у больных с ХВГС+В — $132,78 \pm 15,98$ и $82,3 \pm 11,77$ Ед/л соответственно ($p < 0,05$). После терапии раствором глюкозы у больных с ХВГС активность ЩФ снизилась на 29% ($p < 0,05$). В то же время у больных с ХВГС+В активность ЩФ даже повысилась на 20% до $102,6 \pm 11,42$ Ед/л.

Активность ЩФ у больных, которые помимо противотуберкулёзной терапии получали АРВТ, оказалась на 9% выше, чем у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию — $105,8 \pm 14,49$ и $96,5 \pm 24,24$ Ед/л соответственно, однако достоверных различий не имела.

На фоне гепатопротекторной терапии у больных, получающих АРВТ, показатель активности ЩФ снизился на 4%, в то время как у больных,

получающих только противотуберкулёзную терапию, показатель ЩФ даже увеличился.

Таким образом, на фоне терапии снижение показателя активности ЩФ было отмечено в обеих подгруппах больных, однако статистически достоверным оно оказалось только у больных ПГ2.

Показатель активности ЩФ у больных с ХВГС в обеих группах оказался выше, чем у больных с ХВГС+В и у больных без хронических вирусных гепатитов, причем у больных из ПГ2 отличие было еще и статистически достоверным.

На фоне лечения в обеих группах было отмечено снижение активности ЩФ у больных с ХВГС и у больных без хронических вирусных гепатитов, а у больных с ХВГС из ПГ2 это снижение оказалось статистически достоверным.

У больных с ХВГС+В показатель активности ЩФ увеличился как в ПГ1, так и в ПГ2 (на 5% и 20% соответственно).

Активность ЩФ у больных, которые помимо противотуберкулёзной терапии получали АРВТ, оказалась выше, чем у больных, которые получали только противотуберкулёзную терапию.

Уровень активности ГГТ в обеих подгруппах больных до начала лечения более чем в 3 раза превышал лабораторную норму (до $55,0$ Ед/л). На фоне применения ремаксола у больных ПГ1 произошло снижение активности ГГТ с $186,75 \pm 50,42$ до $140,1 \pm 20,79$ Ед/л. В то время как на фоне применения глюкозы у больных в ПГ2 активность ГГТ даже увеличилась с $193,21 \pm 28,63$ до $201,1 \pm 24,59$ Ед/л (на 4%). При этом в период окончания лечения у больных ПГ1 уровень ГГТ оказался достоверно ниже, чем у больных ПГ2 ($p < 0,05$).

В ПГ1 показатель активности ГГТ снизился у 63,9% больных, а у 36,1% повысился. В то же время в ПГ2 снижение показателя активности ГГТ отмечено только у 47,4% больных, а у 52,6% он повысился. Индивидуальная динамика показателя активности ГГТ в ПГ1 и ПГ2 составила $-11,7$ и $+12,7$ Ед/л соответственно.

У больных ПГ1 с ХВГС до начала терапии ремаксолом уровень активности ГГТ был на 31,5% выше, чем у больных с ХВГС+В — $181,7 \pm 66,57$ и $124,5 \pm 66,62$ Ед/л соответственно. По окончании курса ремаксола у больных с ХВГС уровень активности ГГТ снизился на 8,8%, в то время как у больных с ХВГС+В уровень ГГТ вырос на 47%.

У больных ПГ2 с ХВГС уровень активности ГГТ был на 37% выше, чем у больных с ХВГС+В — $205,8 \pm 34,49$ и $130,17 \pm 34,72$ Ед/л соответственно. После терапии раствором глюкозы у больных с ХВГС уровень активности ГГТ снизился до $204,29 \pm 30,1$ Ед/л (на 1%). У больных с ХВГС+В активность ГГТ увеличилась до $239,15 \pm 123,6$ Ед/л (на 46%).

У больных ПГ1, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, уровень ГГТ был

самым низким — $83,6 \pm 57,5$ ЕД/л, хотя и превышал лабораторную норму в 1,5 раза. Он оказался в 2,2 раза ниже, чем у больных с ХВГС, и в 1,5 раза ниже, чем у больных с ХВГС+В. После курса ремаксола показатель активности ГГТ у этих больных снизился на одну треть — до $57,0 \pm 1,95$ ЕД/л.

Уровень активности ГГТ у больных, которые кроме противотуберкулёзной терапии получали АРВТ, оказался на 62% выше, чем у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию — $372,8 \pm 121,69$ и $141,8 \pm 17,99$ ЕД/л соответственно ($p < 0,05$).

На фоне гепатопротекторной терапии у больных, получающих АРВТ, показатель активности ГГТ снизился до $323,6 \pm 95,62$ ЕД/л (на 13%), в то время как у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию, показатель ГГТ снизился лишь до $139,1 \pm 38,75$ ЕД/л (на 2%).

Таким образом, у больных ПГ1 и ПГ2 уровень активности ГГТ до начала лечения был практически одинаков и более чем в 3 раза превышал лабораторную норму. Применение ремаксола привело к снижению показателя активности ГГТ у больных ПГ1, в то время как на фоне глюкозы в ПГ2 показатель активности ГГТ даже несколько увеличился и на момент окончания лечения оказался достоверно выше, чем у больных ПГ1.

В обеих подгруппах у больных с ХВГС уровень активности ГГТ оказался выше, чем у больных с ХВГС+В и у больных без хронических вирусных гепатитов, причем у больных из ПГ2 отличие было ещё и статистически достоверным.

На момент окончания лечения у больных с ХВГС уровень активности ГГТ в ПГ1 снизился на 8,8%, в то время как в ПГ2 снижение произошло только на 1%. При этом у больных без хронических вирусных гепатитов из ПГ1 показатель ГГТ снизился на одну треть. Напротив, у больных с ХВГС+В в обеих подгруппах на фоне лечения отмечено повышение уровня активности ГГТ.

Проведение антиретровирусной терапии у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией приводит к достоверно значимому повышению уровня активности ГГТ.

Показатель общего антиоксидантного статуса (ОАСт) у больных ПГ1 и ПГ2 до начала лечения составил $299,09 \pm 7,51$ и $320,62 \pm 11,56$ мкмоль/л, что соответствовало среднему уровню антиоксидантного статуса (280—320 мкмоль/л).

На фоне применения ремаксола у больных ПГ1 произошло некоторое (на 3%) повышение показателя ОАСт до $308,31 \pm 7,48$ мкмоль/л, в то время как в ПГ2 показатель ОАСт вырос лишь на 0,5%.

В ПГ1 снижение показателя ОАСт отмечено у 28,6% больных, в то время как у 68,6% он повысился, а у 2,8% не изменился. При этом в ПГ2 показатель ОАСт снизился у 42,1% больных, а повысился у 57,9%. Индивидуальная динамика

повышения показателя ОАСт в ПГ1 и ПГ2 составила +9,43 и +4,2 мкмоль/л соответственно.

У больных ПГ1 с ХВГС и с ХВГС+В до начала терапии ремаксолом показатель ОАСт был практически одинаков — $294,3 \pm 10,28$ и $297,6 \pm 14,72$ мкмоль/л соответственно. По окончании курса ремаксола у больных с ХВГС показатель ОАСт увеличился до $300,0 \pm 8,12$ мкмоль/л, у больных с ХВГС+В показатель ОАСт вырос на 9%.

У больных ПГ1, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, показатель ОАСт составил $324,3 \pm 15,46$ мкмоль/л и был на 9% выше, чем у больных с ХВГС, и на 8% выше, чем у больных с ХВГС+В. После курса ремаксола показатель ОАСт у этих больных практически не изменился и составил $323,6 \pm 101,59$ мкмоль/л.

В ПГ2 у больных с ХВГС показатель ОАСт был на 7% выше, чем у больных с ХВГС+В — $335,65 \pm 7,49$ и $313,76 \pm 32,06$ мкмоль/л соответственно. После терапии раствором глюкозы у больных с ХВГС показатель ОАСт снизился на 3% — до $324,83 \pm 11,12$ мкмоль/л. У больных с ХВГС+В показатель ОАСт увеличился на 4% — до $328,45 \pm 85,04$ мкмоль/л.

У больных ПГ2, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, показатель ОАСт составил $365,86 \pm 41,12$ мкмоль/л и был на 8% выше, чем у больных с ХВГС, и на 14% выше, чем у больных с ХВГС+В.

Уровень ОАСт у больных, которые кроме противотуберкулёзной терапии получали АРВТ, практически не отличался от тех, которые получали только противотуберкулёзную терапию ($295,6 \pm 21,7$ и $299,1 \pm 9,22$ мкмоль/л соответственно).

На фоне гепатопротекторной терапии показатель ОАСт увеличился на 3% как у больных, получающих АРВТ, так и у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию, до $304,5 \pm 26,72$ и $309,3 \pm 7,48$ мкмоль/л соответственно.

Таким образом, показатель ОАСт у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией соответствует среднему уровню общего антиоксидантного статуса. Показатель ОАСт при применении ремаксола повысился больше, чем при лечении раствором глюкозы, однако достоверных различий не имел.

У больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией, в крови которых отсутствуют маркёры вирусных гепатитов, показатель ОАСт выше, чем у больных с хроническими вирусными гепатитами.

Проведение АРВТ у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией не влияет на уровень показателя ОАСт.

Показатель общей антиоксидантной способности (ОАСп) у больных ПГ1 и ПГ2 до начала лечения составил $0,078 \pm 0,00338$ и $0,078 \pm 0,00235$ мМ соответственно.

На фоне применения ремаксола у больных ПГ1 произошло повышение показателя ОАСп на

8% — до $0,0851 \pm 0,0053$ мМ. В ПГ2 показатель ОАСп снизился на 4% — до $0,075 \pm 0,0036$ мМ.

В ПГ1 показатель ОАСп снизился у 45,7% больных, у 48,6% повысился, а у 5,7% остался без динамики. В то же время в ПГ2 снижение показателя ОАСп отмечено у 63,2% больных, а повышение только у 36,8%.

Индивидуальная динамика показателя ОАСп в ПГ1 и ПГ2 составила $+0,006$ и $-0,007$ мМ соответственно.

У больных ПГ1, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, показатель ОАСп составил $0,042 \pm 0,026$ мМ и был на 49% ниже, чем у пациентов с ХВГС, и на 32% ниже, чем у больных с ХВГС+В. После курса ремаксола показатель ОАСп у этих больных вырос на 49% — до $0,083 \pm 0,041$ мМ.

У больных в ПГ1 с ХВГС до начала терапии ремаксом показатель ОАСп был на 24% выше, чем у больных с ХВГС+В — $0,082 \pm 0,004$ и $0,062 \pm 0,009$ мМ соответственно. По окончании курса ремаксола у больных с ХВГС показатель ОАСп снизился на 9% — до $0,075 \pm 0,007$ мМ. У больных с ХВГС+В показатель ОАСп вырос на 44% — до $0,11 \pm 0,041$ мМ.

В ПГ2 у больных с ХВГС показатель ОАСп был на 11% ниже, чем у больных с ХВГС+В — $0,079 \pm 0,0069$ и $0,089 \pm 0,0083$ мМ соответственно. После терапии раствором глюкозы у больных с ХВГС показатель ОАСп снизился на 1% — до $0,078 \pm 0,0046$ мМ. У больных с ХВГС+В показатель ОАСп снизился на 19% — до $0,072 \pm 0,025$ мМ.

У пациентов ПГ2, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, показатель ОАСп составил $0,083 \pm 0,029$ мМ и был на 5% выше, чем у больных с ХВГС, и на 7% ниже, чем у больных с ХВГС+В.

Показатель ОАСп у больных, которые помимо противотуберкулёзной терапии получали АРВТ, оказался на 18% ниже, чем у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию — $0,063 \pm 0,009$ мМ и $0,077 \pm 0,004$ мМ соответственно.

На фоне гепатопротективной терапии у больных, получающих АРВТ, показатель ОАСп увеличился на 23% — до $0,082 \pm 0,0069$ мМ, в то время как у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию, показатель ОАСп повысился на только на 7% — до $0,083 \pm 0,014$ мМ.

Таким образом, применение ремаксола повышает общую антиоксидантную способность крови в большей степени, чем раствор глюкозы.

Проведение антиретровирусной терапии у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией приводит к снижению показателя общей антиоксидантной способности.

Уровень активности глутатион-S-трансферазы (GST) у больных ПГ1 и ПГ2 до начала лечения

составил $121,49 \pm 08,51$ и $128,43 \pm 13,84$ нг/мл соответственно (лабораторная норма 90—280 нг/мл). На фоне применения ремаксола у больных ПГ1 произошло повышение уровня активности GST на 13% — до $138,85 \pm 12,75$ нг/мл. В ПГ2 показатель GST вырос на 8% — до $139,1 \pm 22,14$ нг/мл.

В ПГ1 уровень активности GST снизился только у 38,2% больных, в то время как у 58,8% он повысился, а у 2,9% остался без динамики. При этом в ПГ2 снижение уровня активности GST отмечено у 52,6% больных, а повышение у 47,4%. Индивидуальная динамика показателя уровня активности GST в ПГ1 и ПГ2 составила $+10,8$ и $-6,9$ нг/мл соответственно.

В ПГ1 до начала терапии ремаксом у больных с ХВГС показатель активности GST был на 17% ниже, чем у больных с ХВГС+В — $111,7 \pm 7,57$ и $134,7 \pm 18,4$ нг/мл соответственно. По окончании курса ремаксола у больных с ХВГС показатель GST вырос на 18% — до $137,0 \pm 17,64$ нг/мл. У больных с ХВГС+В показатель GST снизился на 18% — до $110,1 \pm 10,76$ нг/мл.

У больных ПГ1, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, уровень активности GST составил $166,4 \pm 27,89$ нг/мл и был выше, чем у пациентов с ХВГС ($p < 0,05$), и на 19% выше, чем у пациентов с ХВГС+В. После курса ремаксола уровень активности GST у этих пациентов снизился на 16% и составил $139,4 \pm 22,65$ нг/мл.

В ПГ2 у больных с ХВГС уровень активности GST был на 42% выше, чем у пациентов с ХВГС+В — $136,59 \pm 17,69$ и $78,96 \pm 20,43$ нг/мл соответственно ($p < 0,05$). После терапии раствором глюкозы у больных с ХВГС уровень активности GST повысился на 2% — до $139,65 \pm 19,86$ нг/мл. У больных с ХВГС+В уровень активности GST увеличился до $204,07 \pm 306,36$ нг/мл, но различие не достигло уровня статистической достоверности.

У больных ПГ2, в крови которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, уровень активности GST составил $174,88 \pm 44,04$ нг/мл и оказался выше, чем у больных с ХВГС+В ($p < 0,05$), и на 22% выше, чем у больных с ХВГС.

Уровень активности GST у больных, которые помимо противотуберкулёзной терапии получали АРВТ, оказался на 8% ниже, чем у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию — $116,0 \pm 15,75$ и $125,9 \pm 9,97$ нг/мл соответственно. На фоне гепатопротективной терапии у больных, получающих АРВТ, уровень активности GST увеличился на 3% — до $119,8 \pm 9,02$ нг/мл, в то время как у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию, он повысился на 4% — до $130,7 \pm 16,72$ нг/мл.

Таким образом, уровень активности GST у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией в обеих группах больных был ниже средних значений лабораторной нормы. На фоне применения ремак-

сола было достигнуто более выраженное повышение уровня активности GST, чем при лечении раствором глюкозы.

В обеих группах в крови больных, у которых отсутствовали маркёры вирусных гепатитов, уровень активности GST оказался достоверно выше, чем у больных с вирусными гепатитами.

У больных, которые помимо противотуберкулёзной терапии получают АРВТ, уровень активности GST ниже, чем у больных, получающих только противотуберкулёзную терапию.

Заключение

В проведённом исследовании получены данные об эффективности применения гепатопротекторного препарата «Ремаксол» при развитии гепатотоксических реакций на фоне проведения противотуберкулёзной терапии у больных туберкулёзом и ВИЧ-инфекцией. Несмотря на то что у подавляющего числа больных (92,9%) сопутствующим заболеванием был вирусный гепатит, причиной развития цитолитического синдрома являлось токсическое поражение лекарственными препаратами, о чем свидетельствовал высокий уровень нитрита сыворотки крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Туберкулёз в Российской Федерации 2010. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулёзу, используемых в Российской Федерации. М.: 2011; 146—158.
2. ВИЧ-инфекция в Санкт-Петербурге / Под редакцией Белякова Н.А., Рассохина В.В. СПб: 2012; 1: 80.
3. Бобкова М. Р., Самохвалов Е. И., Кравченко А. В. Генетические варианты вируса гепатита С у ВИЧ-инфицированных наркоманов. *Вопр вирусол* 2002; 47: 3: 15—20.
4. Мишин В. Ю. Медикаментозные осложнения комбинированной химиотерапии туберкулёза лёгких. М.: 2007; 245.
5. Кожока Т. Г. Лекарственные средства в фармакотерапии патологии клетки. М.: 2007; 136.
6. Суханов Д. С., Оковитый С. В. Гепатотропные средства в терапии поражений печени противотуберкулёзными препаратами. Учебное пособие. СПб.: 2012; 61.
7. Сологуб Т. В., Горячева Л. Г., Суханов Д. С., Романцов М. Г. и др. Гепатопротективная активность ремаксол при хронических поражениях печени (материалы многоцентрового рандомизированного плацебо-контролируемого исследования). *Клин мед* 2010; 1: 61—64.
8. Александрова Л. Н. Хронический гепатит С: возможность использования антигипоксантов для метаболической коррекции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.: 2012; 22.
9. Власов А. П., Крылов В. Г., Григорьева Т. И., Начкина Э. И. Коррекция синдрома эндогенной интоксикации при остром панкреатите. *Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова*. 2010; 5: 60—64.
10. Власов А. П., Начкина Э. И., Григорьева Т. И., Тарасова Т. В., Потянова И. В. Изучение эффективности ремаксол в терапии респираторного дистресс-синдрома при эндотоксикозе. *Эксперимент клин фармакол* 2010; 5: 23—26.
11. Семенов В. Б., Яковлев А. Ю., Зайцев Р. М., Смирнова Е. М. и др. Метаболическая коррекция желчеоттока при механической желтухе. *Анестезиол реаниматол* 2012; 2: 58—61.
12. Лебедев В. В., Бондаренко И. Н., Авдеева М. Г., Стриханов К. С., Шубич М. Г. Клиническое значение уровня оксида азота в дифференциальной диагностике острых, хронических вирусных и токсических поражений печени. *Инфекц бол* 2010; 8: 1: 19—24.

Роль и место антибактериальной терапии в профилактике нарушений репродуктивной функции у женщин

Е. В. УТКИН, Н. М. ПОДОНИНА, Н. И. КОРДУБАЙЛОВА

ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия», Кемерово

Городская клиническая больница № 2, Кемерово

Городская клиническая больница № 3 им. М. А. Подгорбунского, Кемерово

Role and Place of Antibacterial Therapy in Prophylaxis of Disturbances in Reproductive Function of Women

E. V. UTKIN, N. M. PODONINA, N. I. KORDUBAILOVA

Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo

Municipal Clinical Hospital No. 2, Kemerovo

M. A. Podgorskunsky Municipal Clinical Hospital No. 3, Kemerovo

Проведено одномоментное ретроспективное исследование 350 первичных медицинских документов пациенток, получавших стационарное лечение по поводу сальпингоофорита в 2010—2011 гг., результаты которого были сопоставлены с результатами изучения современной этиологической структуры воспалительных заболеваний придатков матки (ВЗПМ) — по данным микробиологического обследования 117 пациенток с сальпингоофоритами и с определением чувствительности выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Проанализирована частота и эффективность использования отдельных антибактериальных препаратов и их комбинаций при различных клинических формах ВЗПМ. Проведена оценка овариального резерва у 87 пациенток после перенесённого сальпингоофорита, из которых 52 — перенесли эпизод обострения хронического процесса и 35 — первый эпизод острого воспалительного процесса придатков матки. Овариальный резерв оценивался посредством определения анти-Мюллера гормона (АМГ), базального уровня ФСГ, объёма яичников и количества антральных фолликулов. Статистически значимое уменьшение овариального резерва при хронизации сальпингоофорита подтверждает необходимость рациональной терапии острого воспалительного процесса.

Ключевые слова: сальпингоофорит, антибактериальная терапия.

One-stage retrospective analysis of 350 primary medical documents of the female patients treated under hospital conditions for salpingo-oophoritis in 2010—2011 was performed. The results were compared with those of the investigation of the present etiological pattern of pelvic inflammatory diseases (PID) by the data of the microbiological examination of 117 patients with PID and susceptibility of the isolates to the antibacterials. The frequency and efficiency of the use of antibacterials alone or in combinations were analysed in the treatment of various clinical forms of PID. The ovarian reserve was estimated in 87 patients after recovery from salpingo-oophoritis. 52 of them had an episode of the chronic process exacerbation and 35 had the first episode of acute PID. The ovarian reserve was estimated by determination of the anti-Mullerian hormone (AMH), basal FSH level, ovarian volume and antral follicle count. A statistically significant decrease of the ovarian reserve in the patients with chronic salpingo-oophoritis confirmed the necessity of rational treatment of the acute inflammatory process.

Key words: pelvic inflammatory diseases, antibacterial therapy.

Введение

Антибиотики принадлежат к числу наиболее часто применяемых в настоящее время лекарственных средств, составляя не менее 15—20% в ряду назначаемых «среднестатистическому» больному препаратов. У пациенток с воспалительными заболеваниями придатков матки (ВЗПМ) количество используемых препаратов данной группы

возрастает в 2—4 раза. При этом нерациональная антибактериальная терапия, частота которой при лечении ВЗПМ достигает 20—77% [1—3], не всегда обеспечивает эрадикацию возбудителя в очаге воспаления, способствуя тем самым рецидивирующему или осложнённому течению инфекции, развитию трубно-перитонеального бесплодия и чревата необходимостью выполнения в последующем радикальных органосохраняющих операций. Следует отметить, что в последние 25 лет преобладающей формой ВЗПМ является именно обострение хронического сальпингоофорита, доля

© Коллектив авторов, 2012

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

которого в структуре всех воспалительных заболеваний органов малого таза достигает 74,5% [4]. Если хронические ВЗПМ есть не что иное, как несвоевременно диагностированные и неадекватно пролеченные острые воспалительные процессы, то изменения, возникающие при остром воспалительном процессе, имеют обратимый характер и при своевременной и правильно проведенной терапии они полностью исчезают [5]. К сожалению, комбинации антибиотиков, рекомендуемые отечественными или зарубежными руководствами и рекомендациями, в реальной клинической практике в РФ применяются лишь в единичных случаях (менее 1%) [6]. Необходимо отметить, что невысокая частота следования национальным рекомендациям наблюдается и в других странах. В частности, частота следования рекомендациям CDC по терапии ВЗПМ в США не превышает 35% [7]. Во многом именно поэтому ВЗПМ доминируют в структуре гинекологической заболеваемости и оказывают существенное влияние на репродуктивное здоровье женщин [3, 8, 9]. ВЗПМ является наиболее частой причиной трубно-перитонеального бесплодия [8]. Помимо этого, хронические сальпингоофориты зачастую сопровождаются выраженным склерозом тканей, с нарушением питания яичникового фолликулярного аппарата, тогда как адекватное кровоснабжение яичника очень важно для его нормального функционирования. Уменьшение кровоснабжения яичника при хронических ВЗПМ способствует развитию в нём соединительной ткани и может привести к массовой гибели фолликулярного аппарата. Возможно также и уменьшение фолликулярного аппарата под воздействием аутоиммунных процессов, когда организм начинает вырабатывать специфические аутоантитела к тканям яичника, что характерно именно для хронических сальпингоофоритов и особенно их деструктивных форм [10]. Антиовариальные антитела разрушают фолликулы и тем самым обедняют яичники. Все это может существенно уменьшить овариальный резерв и, следовательно, уменьшить вероятность наступления беременности в последующем.

С целью изучения сложившейся практики антибактериальной терапии ВЗПМ в г. Кемерово было проведено одномоментное ретроспективное исследование, результаты которого были сопоставлены с результатами изучения современной этиологической структуры ВЗПМ в регионе и с чувствительностью выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам на современном этапе.

Материал и методы

Были проанализированы 350 первичных медицинских документов пациенток с ВЗПМ, получавших лечение по по-

воду данного заболевания в медицинских учреждениях г. Кемерово в 2010—2011 г.

Для изучения особенностей клинического течения и этиологической структуры ВЗПМ было проведено детальное клинико-лабораторное обследование 117 пациенток, включающее определение антиовариальных аутоантител (АОА), бактериоскопическое и бактериологическое исследования. У всех пациенток оценивался овариальный резерв путём определения базального уровня ФСГ на 2—3 дни менструального цикла, в этот же период проводилось УЗИ с определением объёма яичников, подсчёт числа антральных фолликулов и определялся анти-Мюллеров гормон (АМГ).

Микробиологическое исследование включало определение качественного и количественного состава микрофлоры влагалища и цервикального канала. Материал забирали стерильным пластиковым аппликатором транспортной системы Venturi Transsystem Copan (Италия), содержащей и среду Amies, для сбора и транспортировки материала с целью исследования на аэробные и анаэробные микроорганизмы. Параллельно из отделяемого цервикального канала и влагалища готовились нативные препараты, микроскопия которых проводилась с целью возможного выявления этиологического агента. Количественное содержание выделяемых микроорганизмов определяли как среднюю концентрацию колониеобразующих единиц — КОЕ в 1 мл отделяемого. Идентификацию микроорганизмов проводили путём изучения морфологических, культуральных и биохимических свойств с использованием для анаэробов тест-систем ANAEROtest-23 (MIKROLA-test Чехия).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA для Windows, серия 6.0. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

Большинство из обследованных пациенток (91,4%) были в возрасте до 25 лет: до 18 лет — 11 (9,4%), от 18 до 20 лет — 50 (42,7%), от 21 до 25 лет — 46 (39,3%) и старше 25 лет — 10 (8,6%). Все обследованные пациентки не реализовали свою репродуктивную функцию, так как родов не было ни у одной из них, а у 42 (35,9%) не было беременностей.

Лечение по поводу дебюта острого сальпингита получали 69 (59%) пациенток, тогда как у 48 (41%) поводом для проведения стационарного лечения явился эпизод обострения хронического воспалительного процесса. С целью решения основных задач работы, обследованные пациентки были разделены на 2 клинические группы: первую составили пациентки с обострением хронического ВЗПМ, и вторую — с острыми ВЗПМ.

Длительность заболевания до поступления в стационар была менее 2 дней у 41 (35,0%) больной, от 2 до 7 дней — у 46 (39,3%), от 8 до 14 дней — у 23 (19,7%) и у 7 (6,0%) — она составила более двух недель. Большинство из обследованных пациенток — 47 (40,2%) начало заболевания не смогли связать с какими-либо причинами, в то же время у 38 (32,5%) пациенток воспалительный процесс развился сразу же после очередной менструации, у 12 (10,2%) — причиной явились экстрагенитальные заболевания, после проведения искусственного прерывания беременности заболели 7 (6,0%) женщин и еще 3 (2,6%) — после внебольничного аборта, начало болезни связывали с переохлаждением — 5 (4,3%), у 4 (3,4%) — дебют сальпингита был связан с началом половой жизни и у 1 (0,8%) он развился на фоне применения ВМК.

Заболевание у подавляющего большинства больных (110) началось остро с внезапного появления сильных болей в нижних отделах живота, повышения температуры тела. Характер и интенсивность болевых ощущений зависели от выраженности анатомических изменений в малом тазу и степени вовлечения в воспалительный процесс брюшины малого таза. Клиническая картина и данные общепринятых лабораторных методов исследования были характерными для острого сальпингита.

Всем пациенткам была проведена комплексная консервативная противовоспалительная терапия, включающая создание лечебно-охранительного режима, назначение антибактериальных, десенсибилизирующих и обезболивающих препаратов, проведение инфузионно-трансфузионной терапии. Пациенткам с острым сальпингитом, с учётом современных этиологических особенностей в регионе, проводилась двухэтапная антибактериальная терапия. На первом этапе применялись ингибиторозащищённые пенициллины (ИЗП). В частности, применялся амоксициллин/клавуланат (АМО/КК) — Аугментин® (Smith Kline Beecham Pharmaceuticals) или Флемоклав солютаб® (Astellas Pharma Europe B. V.) по 1 таблетке (875 мг + 125 мг) 2 раза в сутки. В случае тяжёлого течения инфекции в первые дни лечения применялось в/в введение аугментина по 1000/200 мг 3 раза в сутки, с последующим переходом на таблетированные формы. На втором этапе использовался джозамицин (Вильпрафен® Astellas Pharma Europe B. V.) по 500 мг 3 раза в сутки.

Результаты и обсуждение

В ходе проведённого исследования было выяснено, что в регионе для лечения острых ВЗПМ использовались преимущественно 5 антимикробных препаратов: метронидазол (86,3%), цiproфлорксацин (60,9%), цефтриаксон (55,1%), гентамицин (31,1%) и цефазолин (13,1%). При этом чаще других использовались следующие комбинации: цiproфлорксацин + метронидазол (8%), метронидазол + цефтриаксон и метронидазол + цефазолин (5,7%), гентамицин + цефазолин и метронидазол + амикацин (4,6%), метронидазол + цiproфлорксацин + кларитромицин (2,3%). После проведённого лечения указанными препаратами полное выздоровление пациенток было констатировано в 201 (57,4%) случае, а в 149 (42,6%) отмечено улучшение.

Для лечения обострений хронических ВЗПМ использовались преимущественно 4 антимикробных препарата: метронидазол (94,9%), цiproфлорксацин (66,7%), цефтриаксон (41,0%) и гентамицин (35,9%). При этом чаще других использовались следующие комбинации: метронидазол + гентамицин + цефазолин (6,8%), метронидазол + цiproфлорксацин (5,1%), метронидазол + цефазолин (3,4%), цiproфлорксацин + клиндамицин (1,7%).

Были прослежены отдалённые результаты у пациенток данной группы на протяжении 1 года. Повторные эпизоды заболевания в течение этого времени были зарегистрированы у 63 (18%) женщин. Следует отметить, что не считали себя здоровыми и отмечали дискомфортные явления после проведённой терапии 132 (37,7%) пациентки, что заставляло их неоднократно обращаться за медицинской помощью. В данном случае следует отметить, что традиционный подход к антибактериальной терапии больных с ВЗПМ, рекомендованный 30 лет назад, широко применяется во многих стационарах и сегодня. Стартовыми препаратами в этом случае являются комбинации цефалоспоринов I поколения с аминогликозидами,

в результате чего риску развития угрожающих жизни осложнений (образование абсцесса, прогрессирование заболевания, хронизация воспалительного процесса) с тяжёлыми медицинскими, социальными и экономическими последствиями подвергаются более 30% женщин, у которых антибактериальная терапия оказывается неэффективной. Длительность применения антибактериальной терапии в указанных группах пациенток (более 10 суток) также в определённой степени связана с тем, что избранная схема была неактивна против возбудителей ВЗПМ.

Полученные результаты были сопоставлены с результатами обследования пациенток основных клинических групп. Диагноз ВЗПМ у них был верифицирован на основании клинических, лабораторных, ультразвуковых и эндоскопических методов исследования. При определении овариального резерва показатели больных первой клинической группы составили: АМГ ($M \pm m$) — $4,25 \pm 0,40$ нг/мл (95% ДИ 3,45—5,05 нг/мл); ФСГ — $5,35 \pm 0,17$ МЕ/л (95% ДИ 5,01—5,70 МЕ/л); объём правого яичника — $8,65 \pm 0,55$ см³ (95% ДИ 7,51—9,78 см³); объём левого яичника — $7,74 \pm 0,94$ см³ (95% ДИ 5,83—9,65 см³); количество антральных фолликулов в правом яичнике — $6,81 \pm 0,54$ (95% ДИ 5,70—7,92); количество антральных фолликулов в левом яичнике — $6,50 \pm 0,49$ (95% ДИ 5,50—7,50).

Показатели больных второй клинической группы составили соответственно: АМГ — $7,14 \pm 0,86$ нг/мл (95% ДИ 5,36—8,91 нг/мл); ФСГ — $4,69 \pm 0,21$ МЕ/л (95% ДИ 4,24—5,15 МЕ/л); объём правого яичника — $11,55 \pm 1,00$ см³ (95% ДИ 9,46—13,63 см³); объём левого яичника — $14,30 \pm 3,20$ см³ (95% ДИ 7,6—21,0 см³); количество антральных фолликулов в правом яичнике — $9,25 \pm 0,49$ (95% ДИ 8,24—10,26); количество антральных фолликулов в левом яичнике — $7,50 \pm 0,65$ (95% ДИ 6,16—8,83).

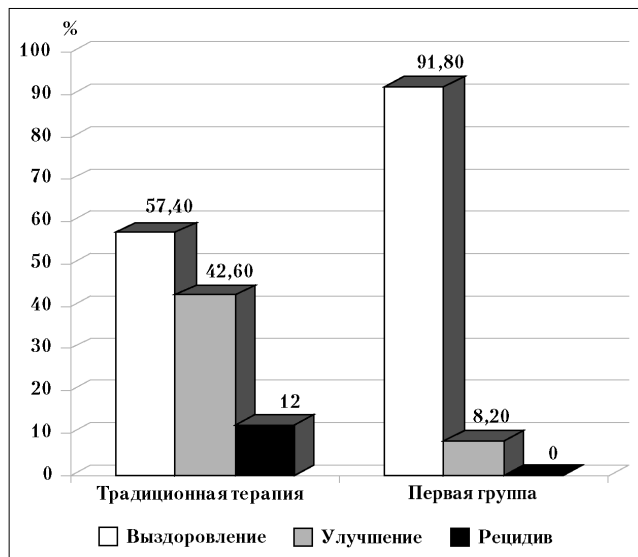
Полученные данные свидетельствуют о статистически значимом снижении показателей оценки овариального резерва у больных после перенесённого эпизода обострения хронического ВЗПМ, в сравнении с показателями пациенток, перенёвших первый эпизод острого сальпингоофорита. В частности: разница показателей АМГ исследуемых клинических групп оказалась статистически значимой ($p=0,002$) и составила 2,89 (95% ДИ 1,92—3,86); статистически значимой ($p=0,020$) оказалась и разница показателей ФСГ, которая составила 0,66 МЕ/л (95% ДИ 0,07—1,25 МЕ/л). При УЗИ правого яичника разница составила: в показателях объёма ($p=0,011$) — 2,9 см³ (95% ДИ 1,84—3,96 см³), в количестве антральных фолликулов ($p=0,002$) — 2,44 (95% ДИ 1,56—3,32). Разница аналогичных средних показателей левого яичника составила: в показателях объёма

($p=0,038$) — $6,56 \text{ см}^3$ (95% ДИ $3,79\text{—}9,32 \text{ см}^3$), в количестве антральных фолликулов ($p=0,215$) — $1,0$ (95% ДИ $0,11\text{—}1,89$).

Повышение содержания АОА было зафиксировано только лишь при обострении хронических ВЗПМ, средние значения которых составили $11,2 \pm 0,5 \text{ Е/мл}$, тогда как показатели пациенток с острыми ВЗПМ не превышали нормальных цифр и составили $6,6 \pm 0,4 \text{ Е/мл}$ ($p < 0,00001$).

При микробиологическом обследовании 87 пациенток с ВЗПМ основных групп были получены следующие результаты: наиболее часто (63,8%) определялись ассоциации от 2 до 5 условно-патогенных микроорганизмов. При этом в большинстве случаев (40%) определялись аэробно-анаэробные, в 33,3% — аэробно-аэробные и в 26,7% — анаэробно-анаэробные ассоциации. Анаэробы в ассоциациях составили 54,1%, а аэробы — 45,9%. При острых ВЗПМ наиболее часто (16,8%) в составе ассоциаций обнаруживались коагулазоотрицательные стафилококки. При этом в составе аэробно-анаэробных ассоциаций в 41,7% случаев встречались *Gardnerella vaginalis* и *Enterococcus* (гемолитический), в 33,3% — *Bacteroides*, в 25,0% — *Candida albicans*, в 16,7% — *Actinomyces*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, представители Enterobacteriaceae. В составе аэробно-аэробных ассоциаций преимущественно определялись *Enterococcus* (60%), в 30% случаев — *Staphylococcus epidermidis* (гемолитический), в 20% — *Candida albicans*, *Escherichia coli* (с гемолитическими свойствами), Enterobacteriaceae (с гемолитическими свойствами), *Staphylococcus hyicus* (гемолитический). Кроме того, в составе аэробно-аэробных ассоциаций встречались: *Staphylococcus hominis* (гемолитический), *S. xylosus* (гемолитический), *Streptococcus agalactiae* (гемолитический) и *Corynebacterium*. *Gardnerella vaginalis* определялась наиболее часто (75%) и в составе анаэробно-анаэробных ассоциаций. Кроме того, в 62,5% случаев встречались *Bacteroides*, в 50% — *Mobiluncus*, в 25% — *Leptotrichia buccalis* и в 12,5% — *Propionibacterium* и *Actinomyces*.

При обострении хронических ВЗПМ наиболее часто в составе ассоциаций микроорганизмов обнаруживались энтеробактерии, среди которых в 71,8% было констатировано наличие *E. coli*. Представители семейства *Streptococcaceae* (*S. faecalis*, *S. faecium*, *S. viridans*) одинаково часто обнаруживались в составе микробных ассоциаций, как при острых, так и при обострении хронических ВЗПМ ($p=0,055$). Только лишь при острых процессах определялись такие микроорганизмы, как *Proteus rettgeri* и *Mobiluncus*, в то же время только лишь при обострении хронических ВЗПМ были обнаружены *Klebsiella pneumoniae* и актиномицеты.



Эффективность проведённой терапии (в %).

Сальпингит у 56 (47,9%) больных развился на фоне имеющегося дисбиотического состояния влагалища (бактериальный вагиноз, вагинальный кандидоз).

Выделенные штаммы микроорганизмов оказались чувствительными в 95—100% случаев к амоксицилину/клавуланату (АМО/КК), цефалоспорином III поколения и фторхинолонам. В частности, штаммы *E. coli*, выделенные от пациенток с острыми ВЗПМ, в 100% случаев оказались чувствительны к цефалоспорином III поколения и в 95% — к АМО/КК и фторхинолонам. Штаммы стафилококков оказались чувствительны к этим препаратам в 100% случаев. В то же время к таким антибиотикам, как ампициллин, тетрациклин и доксициклин, оказались резистентными более 50% выделенных штаммов микроорганизмов.

У всех 117 пациенток после проведённого лечения наступило клиническое выздоровление. Среднее пребывание в стационаре составило $10,1 \pm 0,1$ дня.

После проведённой двухэтапной антибактериальной терапии (АМО/КК + макролид) полное выздоровление было констатировано при терапии острого процесса в 91,8% случаев, что было статистически значимо выше ($p=0,0001$), чем в сравняемой группе, а улучшение — в 8,2% случаев. При этом в течение трёх лет у 31,7% пациенток этой группы наступила беременность. Сравнительные показатели эффективности проведённой терапии представлены на рисунке.

Таким образом, рациональная этиотропная антибактериальная терапия, учитывающая современные региональные этиологические особенности воспалительных процессов внутренних гениталий, позволяет существенно улучшить результаты терапии ВЗПМ.

Выводы

1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что хронизация сальпингоофоритов сопровождается значительным снижением показателей овариального резерва, а это не может не оказать негативного влияния на репродуктивную функцию и возможность наступления беременности у таких больных. В связи с этим только эффективное лечение пациенток с острыми ВЗПМ и, в первую очередь, проведение рациональной антибактериальной терапии позволит сохранить овариальный резерв и тем самым предупредить нарушение репродуктивной функции у таких пациенток.

2. В этиологической структуре современных ВЗПМ преобладают ассоциации условно-патогенных микроорганизмов, поэтому стартовая терапия с использованием препаратов, эффективных в отношении аэробной и анаэробной

микрофлоры, а также и внутриклеточных микроорганизмов должна быть стандартом при лечении данной патологии.

3. Одним из наиболее универсальных режимов эмпирической терапии ВЗПМ, с учётом современных региональных этиологических особенностей заболевания, должна быть комбинация: АМО/КК+макролид (аугментин + вильпрафен).

4. С учётом высокой распространённости ВЗПМ и большого количества недостатков при проведении антибактериальной терапии, представляется целесообразным создание периодически обновляемых региональных клинических протоколов антибактериальной терапии ВЗПМ.

5. Увеличение частоты дисбиотических состояний, на фоне которых развивается до 48% всех случаев ВЗПМ, свидетельствует о необходимости своевременного выявления дисбактериозов и принятия мер к нормализации микрофлоры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пестрикова Т. Ю., Юрасов И. В. Изучение эффективности анти-микробной терапии при различных формах ВЗОМТ у пациенток гинекологических стационаров. Проблемы репродукции. 2012; Специальный выпуск (VI Международный конгресс по репродуктивной медицине): 164.
2. Уткин Е. В., Мишина М. Г., Вакуленко Е. М., Головина А. Н. Современные аспекты рациональной антибактериальной терапии воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин. Мать и дитя в Кузбассе 2011; Спецвыпуск 1: 327—330.
3. Sweet R. L. Treatment strategies for pelvic inflammatory disease. Expert Opin Pharmacother 2009; 10: 5: 823—837.
4. Уткин Е. В., Кулаевский В. А. Основные причины развития и современные тенденции в клиническом течении воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин. Росс вест акушер-гинекол 2008; 8: 1: 40—44.
5. Краснопольский В. И., Буянова С. Н., Шукина Н. А. и др. Лечение гнойно-септических гинекологических заболеваний и их профилактика. Росс вест акушер-гинекол 2007; 7: 1: 63—68.
6. Рафальский В. В., Довгань Е. В., Иванян А. Н., Саврацкий А. Н. Практика применения антимикробных препаратов у женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза в Российской Федерации. Акушер гинекол 2011; 5: 88—93.
7. Jaiyeoba O., Lazenby G., Soper D. E. Recommendations and rationale for the treatment of pelvic inflammatory disease. Expert Rev Anti Infect Ther 2011; 9: 1: 61—70.
8. Газазян М. Г., Хардинов А. В., Сухих Н. В. Оптимизация диагностики и лечения хронических сальпингоофоритов. Росс вест акушер-гинекол 2009; 3: 3: 67—71.
9. Soper D. E. Pelvic inflammatory disease. Obstet Gynecol 2010; 116: 2: 1: 419—428.
10. Серов В. Н., Царегородцева М. В. Хронические воспалительные заболевания органов малого таза: оценка риска развития аутоиммунной овариальной недостаточности. Росс вест акушер-гинекол 2008; 8: 5: 4—9.

Биологически активные нерибосомальные пептиды. III. Механизм биосинтеза нерибосомальных пептидов

Т. И. ОРЛОВА, В. Г. БУЛГАКОВА, А. Н. ПОЛИН

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

Biologically Active Nonribosomal Peptides. III. Mechanism of Biosynthesis of Nonribosomal Peptides

T. I. ORLOVA, V. G. BULGAKOVA, A. N. POLIN

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Третья часть обзора посвящена изучению нерибосомальных пептидов.

Ключевые слова: нерибосомальные пептиды, механизм биосинтеза.

The third part of the review is concerned with investigation of nonribosomal peptides.

Key words: nonribosomal peptides, mechanism of biosynthesis.

Образуемые микроорганизмами биологически активные пептиды, при биосинтезе которых формирование пептидной связи происходит без участия рибосом, получили название нерибосомальных, а мультиэнзимные комплексы, осуществляющие их биосинтез, — нерибосомальных пептидсинтетаз (НРПС) [1, 2].

Этот путь биосинтеза благоприятен для создания многообразия химических структур за счёт включения в биосинтез белковых и небелковых аминокислот, эфирных и тиоэфирных связей вместо амидных, введения модифицирующих фрагментов, образования гибридных систем НРПС с другими белками, образования циклических структур. Преобладает образование циклических структур — циклопептидов и циклодепептидов, которые предохраняют пептиды от деградации пептидазами, увеличивают физико-химическую стабильность, в большей степени отвечают конформационным потребностям при взаимодействии с мишенью. Нарушение циклической структуры приводит к потере биологической активности [1, 2].

Продуктами НРПС являются антибиотики различного спектра действия, противоопухолевые вещества, иммунодепрессоры, токсины, антисклеротические соединения [3–6]. В данной работе представлены литературные данные о механизме биосинтеза нерибосомальных пептидов.

Успехи в этом направлении расширяют перспективы использования микроорганизмов (актиномицетов, бактерий, грибов, многих морских микроорганизмов) в качестве ресурса для получения новых фармацевтических препаратов.

Основные сведения о химических структурах нерибосомальных антибиотиков, механизмах их действия на микробную клетку, механизмов устойчивости продуцентов к собственным антибиотикам, возникновению устойчивости к ним у других микроорганизмов представлены нами в обзорах [5, 6]. Аналогичные сведения относительно нерибосомальных пептидов с разнообразными практически важными биологическими свойствами представлены в обзоре [6].

1. Нерибосомальные пептидсинтетазы (НРПС)

Биосинтез нерибосомальных пептидов осуществляется большими мультиэнзимными системами, состоящими из модульных белков, каждый из которых содержит 1000–1500 аминокислотных остатков и действует как независимый фермент [7]. Основные положения о механизме нерибосомального биосинтеза были заложены в 70-х годах прошлого столетия тремя группами исследователей — F. Lipmann et al. [8], S. Laland et al. [9] и K. Karahashi [10], изучавшими механизм образования грамицидина S и тироцидина культурами *Bacillus brevis*. Предполагалось, что биосинтез нерибосомальных пептидов осуществляется на тиоматрице, где происходит аденилирование субстратной ами-

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12. Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова

нокислоты, а затем связывание её с активной SH-группой 4'-фосфопантотеина (ФП), простетической группой белка-переносчика. При взаимодействии этого интермедиата с соседней тиоэтерифицированной аминокислотой серией реакций транспептидации и транслокации шаг за шагом удлиняется пептидный продукт.

В дальнейшем в результате многочисленных исследований были сформулированы модульные принципы строения и функционирования НРПС [11, 12].

В общем случае НРПС представляет собой линейную конструкцию, состоящую из отдельных модулей, соединенных между собой короткими пептидами (пептиды коммуникационного взаимодействия) (ПКВ) [13]. Каждый модуль отвечает за включение в синтезируемый продукт одной аминокислоты в той последовательности, в какой они запрограммированы в линейной конструкции, в большинстве своём подчиняясь правилу коллинеарности на геномном уровне [14].

По данным [15], в клетке продуцента НРПС расположены вдоль мембраны. Домены в модулях могут иметь различные геометрические формы и располагаться под произвольными углами по отношению друг к другу. Минимальный модуль состоит из трёх ферментов-доменов, связанных между собой небольшими пептидами-линкерами (рис. 1) [3, 16, 17].

Домен А узнает и удерживает из субстратного пула аминокислоту, соответствующую месту данного модуля в системе НРПС, в присутствии ионов магния и АТФ активирует её, превращая в аминокациладенилат [14].

Тиолирующий домен — белок-переносчик (БП) связывает аминокациладенилат аминокислоты с SH-группой ФП и переносит её к каталитическому центру следующего модуля [7].

Образование пептидной связи катализируется конденсационным доменом С, в результате длина синтезируемого пептида увеличивается на одну аминокислоту с С-конца [17].

Крайний С-концевой модуль содержит домен тиоэстеразу (ТЕ), удаляющую готовый пептид с тиоматрицы [2].

Модули могут также содержать эпимеразу, метилтрансферазу и др. [2]. В ряде случаев стартовый модуль дополнен доменом ацилирования N-концевой аминокислоты жирной кислотой [18].

1.1. Инициация биосинтеза нерибосомального пептида. Биосинтез нерибосомального пептида начинается переносом ФП с коэнзима А (Со А) на остаток серина БП, где ФП заякоривается [19]. При этом апо-НРПС превращается в холо-НРПС. Состав и строение стартового модуля зависят от стартовой N-концевой аминокислоты синтезируемого пептида. При стартовой L-аминокислоте это минимальный модуль без домена

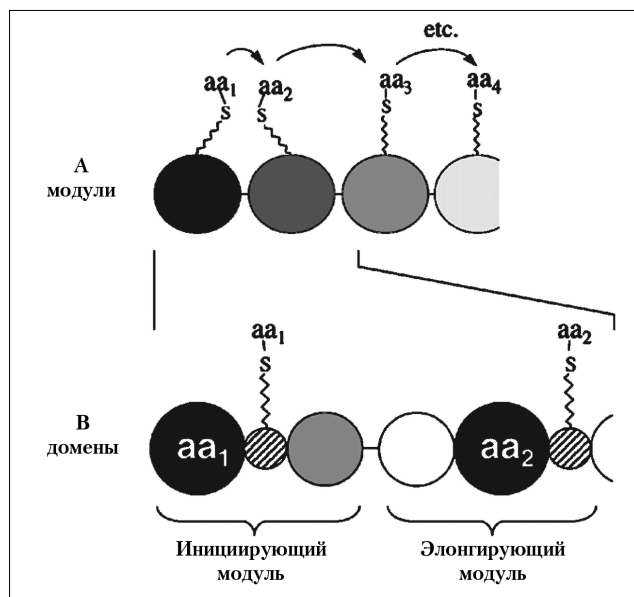


Рис. 1. Общая схема биосинтеза нерибосомальных пептидов [17].

А — aa₁, aa₂, aa₃ и т.д. — модули; каждый включает в пептид одну аминокислоту. В — домены: 1) иницирующий (aa₁), 2) элонгирующий (aa₂).

С. В случае D-аминокислоты модуль дополнен эпимеразой. Эпимеризации подвергается уже активированная L-аминокислота. Однако описаны случаи активации D-аланина [1, 20, 21].

Биосинтез липопептидных антибиотиков начинается с биосинтеза N-ацилированной N-концевой аминокислоты. Стартовый модуль содержит двойной фузирванный домен, который активирует жирную кислоту и переносит её на SH-группу ФП, а затем на NH₂-группу будущей N-концевой аминокислоты [18].

Для активации стартовых небелковых аминокислот существуют гены специальных модулей [21].

1.2. Аденилирующий домен А.

«Узнавание» и аденилирование субстратных аминокислот. Домены А из НРПС относятся к обширному семейству аденилирующих ферментов. Ближе всего — к люциферазе насекомых [22]. Они выбирают и аденилируют (активируют) субстратную аминокислоту согласно запрограммированной первичной структуре синтезируемого пептида и являются поэтому важнейшими доменами модуля [12, 14, 23, 24].

Сравнительное кристаллографическое исследование кристаллических структур люциферазы светлячка и активирующего L-фенилаланин домена А (PhA) из НРПС биосинтеза грамицидина S (продуцент *Bacillus brevis*) положило начало изучению механизма узнавания [11, 22]. Оказалось, что в кристаллических структурах пептидные цепи обоих объектов перегибаются и складываются в виде двух компактных субдоменов, удерживаемых водородными связями (рис. 2). N-концевой, наи-



Рис. 2. Структурные основы активации фенилаланина при нерибосомальном биосинтезе грамицидина S [11].

более обширный субдомен, образованный аминокислотными остатками 17–428 (цифры указывают на положение аминокислоты в пептидной цепи фермента с N-конца) подразделяется еще на три субструктуры. Значительно меньший C-концевой субдомен образован аминокислотными остатками 429–530, он также образует дополнительные субструктуры. На основании сходства кристаллических структур люциферазы и PhA был сделан вывод, что аденилирующие ферменты имеют одинаковую топологию.

Сравнение кристаллических структур, содержащих и не содержащих аденилат фенилаланина,

показало, что образование аденилата вызывает поворот субдоменов на 94° по отношению друг к другу. Активная зона располагается между соседними субдоменами, их поворот закрывает образовавшийся «карман», здесь происходит «узнавание» и аденилирование фенилаланина [11, 12, 25].

Биохимическими, генетическими и кристаллографическими методами было установлено, что карман для активации фенилаланина с одной стороны ограничен Asp 235 и Lys 517 с другой (рис. 3). Стороны разделены индольным циклом триптофана Trp 239 на дне «кармана», связанного каналом с окружающей жидкостью. α -Аминная и карбоксильная группы субстратного фенилаланина стабилизируют его положение взаимодействием с Asp 235 и Lys 517 соответственно (аминокислоты в пептидной цепи фермента с N-конца).

Более 200 аминокислот образуют «карман» PhA, но для удержания в нём L-фенилаланина и его активации необходимы только 8–10 аминокислот: Asp 235, Ala 236, Ile 330, Cys 331 с одной стороны и Ala 322, Ala 301, Ile 299, Thr 278, Lys 517 с другой.

В результате исследования был полностью идентифицирован L-фенилаланин-связывающий карман PhA — его топология, аминокислотные остатки, значимые для узнавания субстратного L-фенилаланина, их положение в пептидной цепи. Было предложено считать PhA структурной моделью, которой могут соответствовать активирующие домены всех НРПС [11].

В последующих работах было показано, что на филогенетическом древе аминокислотные последовательности «карманов» кластировались по признаку активирования одинаковой субстратной аминокислоты, независимо от вида микроорганизма [14]. Из сотни аминокислотных остат-

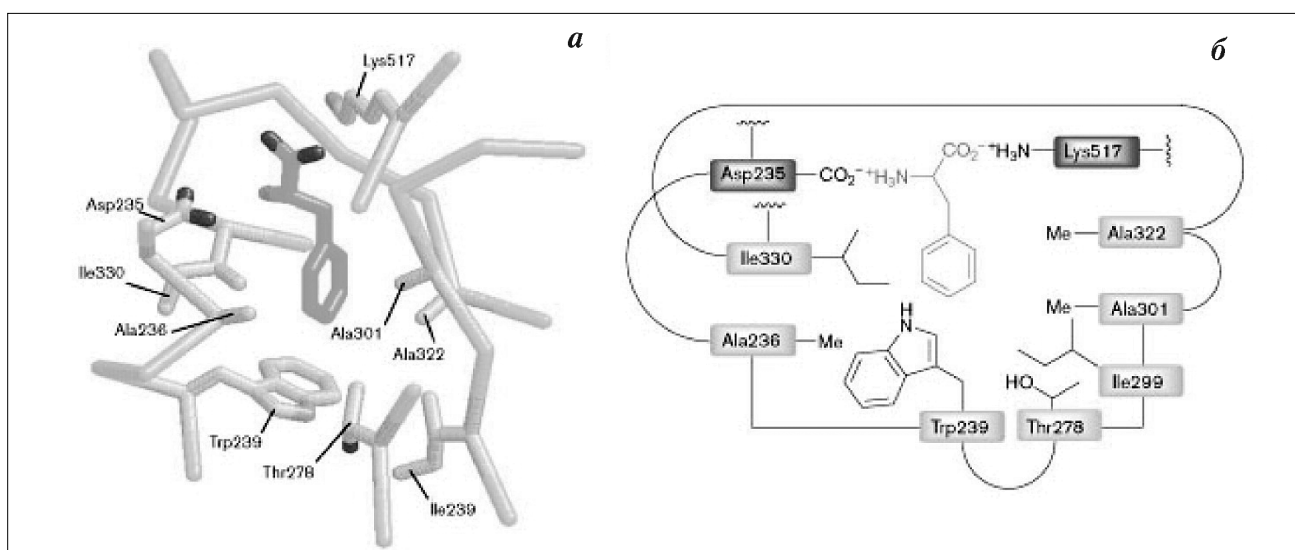


Рис. 3. Предполагаемая структура специфичного «кармана» активации фенилаланина [26]

а — трёхмерное изображение; б — линейная структура.

ков, образующих «карман» домена А, значимыми для узнавания субстратной аминокислоты являлись 8—10 остатков [14, 24].

В группе доменов А, активирующих одинаковые субстраты, значимые аминокислотные остатки были в основном идентичны друг другу, но отличались от значимых остатков (в соответствующих положениях пептидной цепи) эталонного PhA [26], т. е. проявлялась селективность активации.

Идентификация структур, ответственных за специфичность активации субстратных аминокислот «карманами», осуществлялась анализом данных филогенетического древа, водородных связей, электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, проведённым с каждым доменом А из базы данных их аминокислотного состава. Последовательность аминокислотных остатков изучаемых доменов переносили на матрицу (модель PhA) с известными значимыми последовательностями аминокислотных остатков.

Все структуры разделились на две группы, специфичность которых зависела от химической структуры боковой цепи субстратной аминокислоты. Домены, активирующие аминокислоты с полярными боковыми цепями, всегда содержали 1—2 остатка, взаимодействующих с субстратной боковой цепью через водородные и электростатические связи.

Для субстратных аминокислот с гидрофобными боковыми цепями остатки, определяющие специфичность карманов, были, за небольшими исключениями, гидрофобными. Кроме того, обнаруживались вариации в составе остальных значимых остатков. В связи с этим многие из доменов этого типа имеют более низкую субстратную специфичность, чем домены активации полярных аминокислот.

Совокупность представленных данных позволила сформулировать представление о нерибосомальном коде аминокислотной селекции: последовательность аминокислот в нерибосомальных пептидах определяется последовательностью аминокислотных остатков самих синтетаз (домена А), являющихся продуктами трансляции соответствующих генов.

8—10 значимых аминокислотных остатков, образующих активирующий «карман», представляют собой кодоны, аналогичные кодонам рибосомального биосинтеза, а субстратные аминокислоты — антикодоны [14, 24].

Параллельно генетическому коду нерибосомальный код имеет вырожденный характер. Так, возможны случаи, когда «карманы» с одинаковой последовательностью значащих аминокислотных остатков узнавали и активировали различные субстратные аминокислоты; один «карман» мог активировать несколько субстратных аминокис-

лот [26], лейцин, изолейцин, валин активировались несколькими «карманами».

Расшифровка нерибосомального кода позволяет предсказывать тип структуры неидентифицированных аминокислот в синтезируемых продуктах.

1.3. Домен тиолирования (белок-переносчик). Домен тиолирования — белок-переносчик (БП), назначение которого в системе НРПС — перенос промежуточных продуктов биосинтеза в виде тиоэфиров к каталитическим центрам. Структурно он близок БП поликетидсинтетазы. Перенос осуществляется с помощью своеобразной «руки», представляющей собой кофактор ФП, эфирно связанный с ОН-группой серина (Ser 45) белковой части. Источником ФП является CoA [7].

БП и С-концевая часть аденилирующего домена А располагаются на каталитической платформе, образованной N-концевой частью домена А и конденсационным доменом С. При этом возникают условия для продвижения активированного интермедиата (пептида или аминокислоты), связанного с БП, к реакционному центру. Происходит перенос интермедиата с SH-группы ФП на NH₂-группу активированной аминокислоты следующего модуля. Далее происходит каскад однообразных переносов с участием БП соответствующих модулей, т. е. тиолирование и перенос субстратной аминокислоты осуществляется каждым модулем своим БП [7]. Ранее предполагалось, что перенос осуществлялся одним БП для всего мультиэнзима, как это происходит при биосинтезе жирных кислот [8—10].

Полагают, что конформационные изменения домена А во время активации субстрата координируются с положением и конформацией БП, так как параметры «руки» недостаточно велики, чтобы достигать реакционного центра. Возникновение других конформаций позволяет БП и ФП присутствовать в обоих реакционных центрах — исходного модуля и следующего за ним [2].

БП выполняет не только чисто механическую роль, но и принимает участие в контроле узнавания аминокислоты доменом А [7]. Так, исследование 94 БП из различных НРПС показало, что они кластируются по группам, взаимодействующим с доменами эпимеразы, метилтрансферазы, некоторых небелковых аминокислот, т. е. распознают аминокислоты [27].

1.4. Конденсационный домен (образование пептидной связи, элонгация). Образование пептидной связи катализируется конденсационным доменом С. На каталитической платформе происходит нуклеофильная атака БП-связанной аминокислоты модуля n+1 на тиоэфирную связь БП пептида модуля n, происходит её разрыв, пептид (донор) переносится на α -аминную группу БП-связанной аминокислоты модуля n+1 (акцептор).

Пептидная связь удлиняется на одну аминокислоту с С-конца растущего пептида.

Активный центр этого процесса находится в плоскости расположения БП-доменов модулей n и $n+1$ с противоположных сторон конденсационного домена, определённую каталитическую роль играет гистидин 147 [17].

Конденсационный домен принимает участие в узнавании аминокислот, исправляет ошибки, допущенные доменом А. На примере 74 доменов С из различных НРПС показано их кластрирование по группам пар аминокислот, участвующих в реакциях конденсации: L и L, L и N-метиলামинокислота, L и D, α -L и δ -L [24]. Более широкой специфичностью обладает донорная (пептидильная) сторона С доменов, более селективна акцепторная сторона.

Если НРПС не содержит домена эпимеризации E, его заменяет вариант фузирванного белка, совмещающий функции конденсации и эпимеризации (C/E). Эпимеризационная активность вызывается конформационными изменениями C/E домена, которые индуцируются аминокислотами БП (акцептор), необходимым для образования следующей пептидной связи. Эпимеризации не происходит до тех пор, пока БП модуля $n+1$ не будет заряжен акцепторной аминокислотой, после чего происходит образование пептидной связи с хиральностью D/L [28].

Тип домена C/E присутствует в НРПС, синтезирующих синрингомицин [2], артрофактин [28], эндурацин [2] и др.

Часто домен С совмещается с циклизационным доменом циклазой (Cy), которая катализирует дегидратацию серина, треонина, цистеина в молекулах антибиотиков с образованием остатков оксазолина и тиозолина [29], которые при участии O_x (флавиномононуклеотид) превращаются в остатки оксазола и тиазола [24].

1.5. Завершение биосинтеза (терминация). Когда пептид достигает запрограммированной длины, что определяется количеством модулей в НРПС, он покидает БП С-концевого модуля. Снятие готового пептида начинается его переносом с ФП на ОН-группу серина тиюэстеразы (TE) домена С-концевого модуля, при этом образуется пептидил-О-интермедиат, легко гидролизующийся водой.

Дальнейшая судьба этого интермедиата зависит от структуры пептида и тиюэстеразы, но он всегда претерпевает дальнейшие превращения, после чего становится биологически активным веществом.

После гидролиза линейный пептид может остаться линейным, но его С- и N-группы блокируются (линейный грамицидин) [30]. При наличии в структуре пептида внутреннего нуклеофила (например, OH^- , NH_2) образуются цикломакролак-тон или цикломакролактон с боковой цепью [31].

Если в катализе участвует конденсационный домен С, происходит конденсация по типу голова-хвост (циклоспорин, тироцидин) [32].

Описан ряд тиюэстераз, обладающих одновременно свойствами лигазы и тиюэстеразы. Тетрамерная НРПС антибиотика тиюкоралина синтезирует октапептид в качестве фрагмента хинолил-депсипептида. Таким образом, четыре модуля работают дважды, используя механизм повтора [33]. Механизм повтора используется также при биосинтезе грамицидина S [34] и сафрамицина [23].

Тиюэстеразы обладают и рядом других особенностей в зависимости от микроорганизма-продуцента, структуры синтезируемого пептида, индивидуальных свойств НРПС.

Тиюэстераза тироцидин-синтезирующей НРПС образует по типу голова-хвост не только циклопептид, но и циклодепсипептид [32]. Тиюэстераза НРПС сурфактина циклизует синтетический субстрат с образованием этого антибиотика, аналогичная тиюэстераза НРПС мутанта продуцента, имеющая несколько изменённый аминокислотный состав, антибиотика не образует [35].

Высокая субстратная специфичность тиюэстераз связана с природой аминокислоты БП, расположенной рядом с серином, к которому привязана тиюэстераза [27].

Молекулярные основы субстратной селективности доменов А ещё не поняты полностью, но предложенная модель с успехом использована для предсказания селективности вновь открытых НРПС. Нерибосомальные пептиды «растут» в результате последовательного добавления активированных мономеров. Удлиняющаяся цепь каждый раз переносится на следующий модуль, заряженный соответствующей аминокислотой. Когда пептид достигает запрограммированной длины, он покидает матрицу, освобождая биохимический механизм для следующего цикла. Последовательность аминокислотных остатков нерибосомальных пептидов следует из транслируемых последовательностей аденилирующего домена.

2. Гены биосинтеза НРПС и особенности некоторых НРПС

2.1. НРПС и поликетидсинтетазы (ПКС). Значительная часть лекарственных антимикробных препаратов, применяемых в медицинской практике, производится культивированием микроорганизмов, выделенных из природных источников. Эти микроорганизмы в течение длительного времени, измеряемого миллионами лет эволюции, сосуществовали в окружающей конкурентной среде и, следовательно, прошли селекцию на биосинтез антимикробных веществ и образова-

ние собственной устойчивости к активным структурам конкурентных микроорганизмов. Примером могут служить нерибосомальные циклопептиды и циклодепсипептиды, устойчивые к микробным гидролитическим ферментам, хотя продуценты гидролитических ферментов встречаются крайне редко [36].

Нерибосомальные пептиды и поликетиды — экологически важные вторичные метаболиты, образуемые бактериями и грибами. Как и НРПС, ПКС являются мультиферментами и организованы по модульному принципу. Модули располагаются в определенном порядке, образуя линейную конструкцию. Каждый модуль содержит несколько доменов (ферментов) — до 9 видов [37], некоторые из которых аналогичны доменам НРПС. Важной особенностью генов биосинтеза НРПС и ПКС является их способность к горизонтальному переносу как внутривидовому [38], так и между генетически отдалёнными родами [39], что играет важную роль в изменчивости, видообразовании, эволюции прокариотов [40].

Структурное и каталитическое сходство между НРПС и ПКС позволяет их модулям участвовать в комбинированном биосинтезе. Было показано, что существуют молекулярные основы межмолекулярных коммуникаций между модулями НРПС и ПКС, в результате чего возникают природные гибридные продукты двух видов — или их биосинтез не включает функциональные реакции между НРПС и ПКС модулями, или биосинтез катализируется гибридными системами НРПС/ПКС, включая прямое взаимодействие между модулями НРПС и ПКС (именно они ответственны за комбинаторный биосинтез). Каталитические центры в гибридах остаются такими же, как и в НРПС и ПКС. Специфические линкеры могут играть важную роль в коммуникационных взаимодействиях, способствуя переносу растущих интермедиатов между взаимодействующими модулями НРПС и ПКС. Фосфопантотеин-трансфераза с широкой специфичностью переноса важна для получения функциональных гибридных мегасинтетаз НРПС/ПКС/ НРПС/ ПКС или ПКС/ НРПС/ ПКС/ НРПС [41–44].

Мегасистемы, как правило, участвуют в биосинтезе усложнённых структур нерибосомальных пептидов с противоопухолевым действием (см. раздел 2.4).

Хотя нерибосомальный пептидный синтез — ключевой механизм, используемый для синтеза биоактивных пептидных метаболитов микроорганизмами, часто гены НРПС составляют только часть мультигенных кластеров, необходимых для получения готового продукта. Остальной генетический материал может представлять собой гены биосинтеза ПКС, биосинтеза жирных кислот или экзотических аминокислот и др.

В разделах 1.1–1.5 были представлены классические схемы строения и функционирования НРПС и роль каждого домена в этом процессе. В разделах 2.1–2.3 приведены некоторые данные о генах, кодирующих НРПС, особенностях строения и функционирования НРПС, составе аминокислот, участвующих в биосинтезе отдельных конкретных антибиотиков и других соединений с отклонениями от классической схемы.

2.2. Липопептидные антибиотики. *Дантомицин* синтезируется *Streptomyces roseosporus fungicidicus*. Гены биосинтеза небелковых аминокислот — кинуренина и 3-метил-глутаминовой кислоты (структурные компоненты циклической части молекулы антибиотика) расположены рядом с генами НРПС [45, 46].

У продуцента *фриулимицина* *Actinoplanes friuliensis* в кластер генов синтеза антибиотика входят гены биосинтеза пипеколиновой, 3-метил-аспарагиновой, 2,3-диаминомасляной кислоты — структурных компонентов молекулы фриулимицина и гены регуляции биосинтеза и обеспечения устойчивости к собственному антибиотику [37, 47].

В геноме продуцента *микосубтилина* оперон 38 kb интегрирует гены биосинтеза НРПС и β -аминожирной кислоты, образующейся из β -ациотио-эфира (полупродукта биосинтеза жирных кислот) под действием аминотрансферазы. Полагают, что конденсационный домен первого модуля НРПС катализирует присоединение этого тиоэфира к первой активированной аминокислоте в системе НРПС [31].

Сирингомицин синтезируется *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Кластер генов биосинтеза антибиотика состоит из двух частей, разделённых участком 175 bp, правило коллинеарности не соблюдается, отсутствует единая транскрипционная единица, отсутствуют домены эпимеразы [48, 49].

У продуцента *фузарицидина* *Paenibacillus polymyxa* кластер генов биосинтеза содержит 32,4 kb, кодирует шестимодульную НРПС. Вторым, четвёртым и пятым модули содержат домены эпимеразы. Шестым модуль не содержит этого домена, но домен А активирует D-аланин непосредственно. Кластер генов включает гены, участвующие в биосинтезе липидной части молекулы. Гены, определяющие регуляцию синтеза, системы транспорта антибиотика из клетки и антибиотикоустойчивость, не обнаружены [20].

2.3. Антибиотики, не являющиеся липопептидами. Антибиотики грамицидины синтезируются вариантами культур *Bacillus brevis*. Кластер генов биосинтеза *линейного грамицидина* расположен на двух непересекающихся фосмидах и вместе с фрагментом-мостиком в 13 bp. занимает участок 74 kbp, 4 рамки считывания кодируют НРПС с двумя, четырьмя, шестью и четырьмя модулями

соответственно. Среди 16 модулей семь доменов эпимеризации, домен формилирования, слившийся с первым модулем, и домен редуктазы, прикнувшийся к С-концевому модулю. С-концевой глицин предположительно восстанавливается соседним доменом редуктазы до этаноламина [30].

Особенность НРПС *граммидина С* состоит в том, что двухмодульная тиоэстераза обладает активностью лигазы и циклазы, вследствие чего пятимодульная НРПС синтезирует циклодекапептид, т. е. работает механизм двукратного повтора. Первый экземпляр синтезированного пентапептида образует эфирную связь с серином (активный центр тиоэстеразного домена). Второй экземпляр пентапептида взаимодействует с соседним БП с образованием декапептидил-тиоэфира, который затем переносится на тиоэстеразу и циклизуется с образованием циклодекапептида [34].

У *напсамиина* — уридилпептидного антибиотика, образуемого *Streptomyces* DSM5940, 3'-дезоксиуридин связан амидной связью с карбоксильной группой N-метил-2,3-диаминомасляной кислоты, которая ацилирована по одной из аминных групп 6-окситетрагидроизохинолиновой кислотой, а по другой — метионином или метилтирозином. Анализ кластера генов показал, что структура пептидного ядра строится нелинейным нерибосомальным синтезом — механизмом, использующим одиночные или двудоменные белки. Направление биосинтеза пептидной цепи дважды меняется. Антибиотики этой группы (муредомицин, пасидамицин) ингибируют бактериальную транслоказу, подавляя биосинтез пептидогликана [50].

2.4. Противоопухолевые соединения. Синтезируемый *Chromobacterium* бициклический противоопухолевый *денсуненмид FK228* представляет собой 16-членный макролактон, имеющий общую эфирную связь с 17-членным циклом, содержащим дополнительно дисульфидную связь. В структуру входят: блок из трёх аминокислот (D-cys, D-val, Val), 2,3-дегидротреонин, L-(S,E)-3-окси-7-меркапто-4-гептеновая кислота. Последняя образована одним остатком цистеина и двумя углеродными единицами C₂ из малонил-CoA. Депсипептид FK228 синтезируется гибридной системой НРПС/ПКС/НРПС с дополнительной активностью образования дисульфидной связи [51]. Однако используемые в реакции два модуля ПКС утратили функцию домена ацетилтрансферазы. Этот недостаток, возможно, восполняет ацетилтрансфераза синтетазного комплекса жирных кислот, т. к. гены этого комплекса обнаружены в кластере генов биосинтеза FK228 [52].

Лейнамидин — макролактон, *спио*-связанный с 1,3-диоксо-1,2-дитиолоном, образуется *Streptomyces atrovivaceus*. Биосинтез осуществляется мегагибридной синтетазой, гены которой

расположены на двух пересекающихся космидах. Для образования структуры необходимы два модуля НРПС и 6 модулей двууглеродных единиц из ПКС. Аденилирующий домен иницирующего модуля НРПС активирует непосредственно D-аланин, связывает его в положении транс с БП, образуя интермедиат D-Ala-S-БП как результат специфических коммуникаций между белками А и БП. Домен А второго модуля активирует цистеин, связывает его с БП, образуя конструкцию C_γ-C_γ-А-БП-О_х. Один C_γ катализирует образование пептидной связи с D-Ala, второй вызывает циклизацию дипептидного интермедиата с образованием тиазола. Домен О_х превращает его в тиазол, затем ПКС завершает элонгацию углеродного скелета молекулы [21, 53, 54].

Кластер генов агликона гликопептидного антибиотика *блеомицина* (продуцент *Streptomyces verticillus*) содержит 10 генов НРПС, кодирующих 9 модулей, и один ген ПКС, кодирующий один модуль ПКС. Клонированием и биохимическими экспериментами показано, что в биосинтезе блеомицина участвуют модули НРПС и ПКС, образуя мегасинтетазу НРПС/ПКС/НРПС, служащую моделью для гибридных систем НРПС/ПКС или ПКС/НРПС. Каталитические центры одинаковы в гибридных и негибридных системах НРПС и ПКС. Специфические внепептидные линкеры играют важную роль во внемодульных взаимодействиях для переноса растущих интермедиатов между модулями НРПС и ПКС [43, 44].

Сафрамицин, синтезируемый *Streptomyces lavendulae*, относится к тетрагидроизохинолиновому семейству антибиотиков. Секвенированием установлено 30 генов, составляющих кластер: необычная НРПС, сшивающие ферменты, белки устойчивости и регуляции биосинтеза. НРПС содержит три аденилирующих модуля для включения в пептид аланина, глицина и тирозина. Однако синтезируется тетрапептидил-интермедиат, что не соответствует правилу коллинеарности. Полагают, что последний модуль, включающий тирозин, повторяет образование пептидной связи дважды [23].

Актиномицин С₃ (актиномицин D) образуется *Streptomyces chrysomallus* при окислительной конденсации двух молекул антраноил-пентапептидил лактона (антраноил — остаток 4-метил-3-окси антраниловой кислоты, 4-МОА). При этом возникает хромофорная часть молекулы антибиотика [55].

4-МОА-пептидолактон синтезируется НРПС-АМ-синтетазой, гены которой расположены на хромосоме в середине кластера генов и организованы в виде двух транскрипционных единиц, отделённых пространственно друг от друга. Иницирующий модуль содержит домен, активирующий 4-МОА, и домен БП. Две мульти-

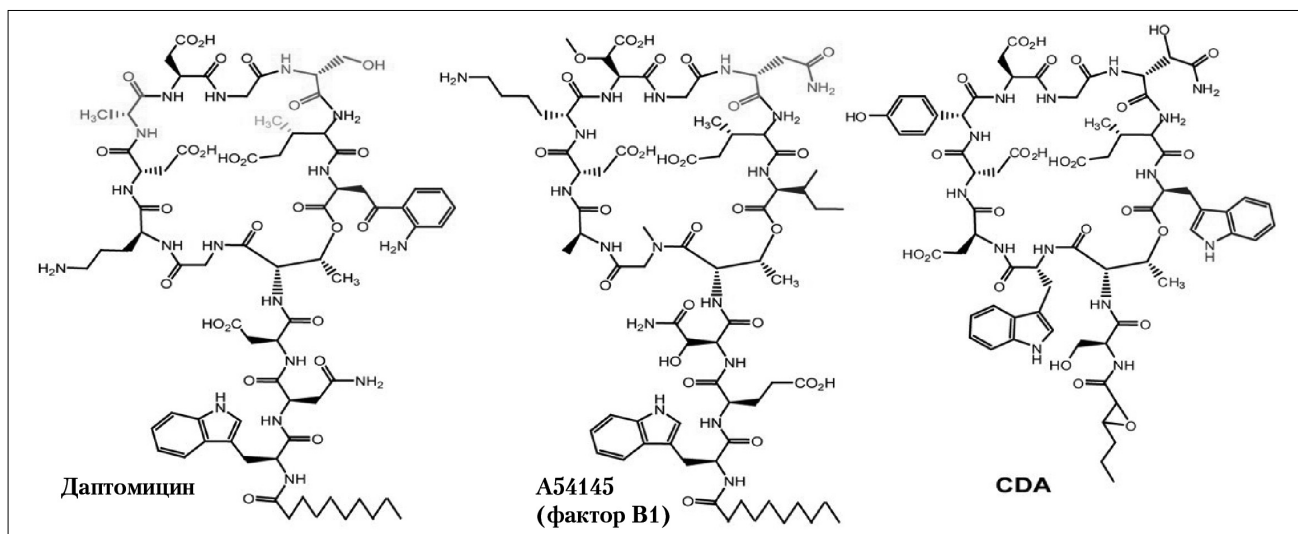


Рис. 4. Химическая структура Са-зависимых липопептидов [72].

функциональные субъединицы состоят из 5 модулей, последний модуль содержит ТЕ, снимающую пептидолактон с матрицы.

Гены, кодирующие АМ-синтазы, попарно ориентированы инверсивно [56]. В кластер генов входят также гены: биосинтеза 4-МОА как продукта деградации триптофана, гены N-метилтрансферазы, феноксазидин синтазы, принимающей участие в окислительной конденсации 4-МОА-пентапептидолактонов, гены белков, определяющих устойчивость продуцента [57, 58].

Продуцентом *тиоокоралина* является морской актиномицет. Вещество представляет собой бициклический тиюктадепсипептид, N-концевые группы которого ацилированы 3-окси-хинолиновой кислотой. НРПС содержит 4 модуля, достаточных только для биосинтеза тетрапептида D-Cys-Gly-NMet-Cys-3,5-ди-Met-LCys. Однако в результате того, что ТЕ данной НРПС функционирует как повторяющаяся лигаза, синтезируя второй экземпляр тетрапептида, при этом образуется тиюктадепсипептид. В то же время ТЕ является платформой, катализирующей макролактонизацию и макротриоллактонизацию. Две тиолактонные связи образуются между SH-группой цистеина одного тетрапептида и карбоксильной группой 3,5-N,S-диметилцистеина второго тетрапептида [33].

3. Перепрограммирование НРПС

В 50-х годах прошлого столетия был предложен метод «направленного биосинтеза», целью которого была модификация аминокислотного состава антибиотиков-полипептидов [59]. Метод основан на замещении структурных аминокислотных остатков в антибиотиках в процессе культивирования продуцента в присутствии определенных экзогенных аминокислот. При этом

предполагалась низкая специфичность ферментов биосинтеза данного антибиотика.

Были получены многочисленные «биосинтетические» актиномицины с интересными фармакологическими свойствами [60–63] и сафрамицины [64].

Успехи в изучении механизма биосинтеза нерибосомальных пептидов, установление модульного строения НРПС пробудили генно-инженерный интерес — перепрограммировать НРПС с целью получения новых вариантов пептидов, более эффективных по фармакологическим показателям.

Прослеживается несколько инженерных стратегий генетических манипуляций как на уровне изменения субстратной специфичности «узнающих» и активирующих доменов А, так и на уровне замены целых модулей. Были использованы разнообразные методы генной инженерии: модульный обмен с участием плазмид, фузия модульных белков, хемоэнзиматический биосинтез с использованием циклаз, мутагенез, блокирующий некоторые энзиматические пути.

Основные работы проведены с НРПС даптомицина и его аналогов, тироцидина, сарфактина.

Антибиотики липопептиды даптомицин, CDA и A54145 близки между собой по химической структуре, содержат 13 аминокислот, 10 из которых образуют циклопептид, а 3 аминокислоты — экзоциклические, ацилированные жирными кислотами. Антибиотики отличаются друг от друга несколькими небелковыми аминокислотами (рис. 4). Это обстоятельство делает достаточно удобным проведение экспериментов по перепрограммированию НРПС с продуцентами именно этих антибиотиков.

Отсутствие природной конкуренции и применение различных методов трансформации для большинства рекомбинантных штаммов проду-

центров нерибосомальных пептидов *in vivo* нарушает нормальное функционирование генов этих штаммов. Для устранения этого влияния генно-инженерными методами сконструирован штамм *Bacillus subtilis* с искусственной хромосомой, суррогатный хозяин для биосинтеза бацитрацина. Часть хромосомы *B. subtilis*, кодирующую сарфактинсинтетазу, замещали частью хромосомы продуцента бацитрацина *Bacillus licheniformis*. Суррогатный хозяин экспрессировал гены чужеродной НРПС с высоким выходом бацитрацина, включая посттрансляционную модификацию молекулы бацитрацина и гены устойчивости к антибиотику [65].

Два первых модуля НРПС биосинтеза тироцидина *Bacillus brevis* в определенных условиях образуют фенилаланил-пролил — дикетопиперазин, обладающий антибиотической активностью. Ген этих двух модулей в гетерологичном хозяине *E. coli* синтезирует дикетопиперазин с хорошим выходом, продукт выделяется в среду, нетоксичен для *E. coli* [66].

Тиоэстеразы НРПС в большинстве случаев обладают циклазной активностью и находят применение как в циклизации природных пептидов, так и в циклизации субстратов, синтезируемых твердофазным синтезом [1]. Циклазы являются подвижными катализаторами и могут быть использованы для генерации новых нерибосомальных пептидов.

Было показано, что синтетаза сарфактина может быть модифицирована перенесением региона С-концевой тиоэстеразы на конец того или иного домена А с образованием новых усеченных пептидов с предсказуемой последовательностью аминокислотных остатков [67].

Рекомбинантная циклаза нерибосомальной пептидсинтетазы Са-зависимого липопептида CDA была использована в качестве инструмента для получения новых производных даптомицина. Тиоэфиры синтетических линейных ундекапептидов, по аминокислотному составу идентичные CDA и отличающиеся от даптомицина остатками в положении 6, были циклизованы действием циклазы из НРПС биосинтеза CDA. Сочетание химического синтеза пептидов с их энзиматической циклизацией позволило получить ряд производных даптомицина, различающихся остатками в положении 6. Полностью химическим синтезом получить подобные структуры затруднительно [68, 69].

Получены разнообразные аналоги даптомицина, модифицированные в его циклической части. В работе использовали НРПС биосинтеза нативных антибиотиков CDA и A54145, близких даптомицину по структуре и аминокислотному составу. Модифицированные антибиотики получали посредством γ Red рекомбинаций, комбинируя единственный и мультимодульный обмен, субъединич-

ный обмен, инактивацию сшивающего фермента 3-метилтрансферазы. Элиминация модулей осуществлялась удалением соответствующих линкеров, связывающих модули. Среди полученных аналогов не было вариантов, превосходящих даптомицин по фармакологическим показателям, однако обнаружили некоторые закономерности в рамках проблемы аминокислотный состав — активность. Аминокислоты в положениях 12 и 13 играют ключевую роль для уровня антибиотической активности, а в положении 11 — незначительную. В положении 8 возможны Ser или Lys при условии Asn в положении 11 [45].

Делеционным мутагенезом и конъюгационным переносом плазмидой из *E. coli* был разработан метод генетической модификации *Streptomyces fradiae* — построение искусственной бактериальной хромосомы. Хромосома была клонирована с помощью плазмидного вектора в *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces roseosporus*, в мутанты *Streptomyces fradiae* с подавленной функцией метилтрансферазы. Некоторые новые липопептиды были высокоактивны против стафилококков и пневмококков и не связывались с сывороткой крови [70, 71].

Осуществлялся модульный обмен на стадии нуклеиновых последовательностей, кодирующих межмодульные линкеры в гене двухмодульной субъединицы НРПС, которая включает в даптомицин 3-метил-глутаминовую кислоту (3-метGlu₁₂) и кинуренин (Kyn₁₃) в даптомицин. Гибридные субъединицы были получены фузией модуля 3мGlu₁₂ с концевыми модулями из НРПС антибиотиков CDA или A54145. Рекомбинанты образовывали с высоким выходом аналоги даптомицина, содержащие Trp₁₃ или Ile₁₃. Рекомбинант с гибридным модулем, содержащий дидомен из DKyn₁₃, продуцировал аналог даптомицина, включающий D-Asn₁₃ [45].

Генно-инженерными методами сконструирована надёжная биосинтетическая платформа для получения новых нерибосомальных антибиотиков в достаточных количествах для их дальнейшего исследования. Была применена γ Red рекомбинация, чтобы произвести замены одиночных или мультиплетных модулей в субъединице D_{pl}BC из НРПС для модификации циклической пептидной части антибиотика даптомицина. Комбинировали обмен модулей, НРПС-субъединиц, инактивировали 3-метилтрансферазу, природные варианты липидного остатка. В результате была создана библиотека новых липопептидов, некоторые из них были активны против грамположительных бактерий на уровне даптомицина. Один компонент был активнее даптомицина против *E. coli imp*, мутанта с большей проницаемостью внешней мембраны [72].

4. Нерибосомальный и рибосомальный пептидный синтез

Сравнительное рассмотрение нерибосомального и рибосомального пептидного синтеза с точки зрения образования пептидной связи показывает, что, несмотря на существенные различия, между ними есть и значительное сходство.

1. В обоих случаях биосинтез происходит в 4 этапа: инициация, узнавание аминокислоты и её активация, элонгация и терминация.

2. Источником энергии биосинтеза является АТФ (активация аминокислоты).

3. Пептидная цепь растёт с N-конца к C-концу продукта.

4. Первичная структура синтезируемого пептида определяется кодом — генетическим кодом в рибосомальном биосинтезе, нерибосомальным кодом в нерибосомальном биосинтезе [13, 14, 24].

5. Оба кода имеют вырожденный характер: одна и та же аминокислота (некоторые аминокислоты) может кодироваться несколькими кодонами, один кодон может кодировать несколько аминокислот [26].

6. В обоих случаях непосредственное образование пептидной связи (элонгация) происходит в результате химической реакции нуклеофильного замещения [26] между C-концевой группой растущего пептида и свободной аминной группой последующей активированной аминокислоты. Реакция катализируется пептидилтрансферазой при рибосомальном биосинтезе и конденсационным доменом C при нерибосомальном.

Биологический смысл каждого из четырёх этапов аналогичен один другому, но осуществляются этапы разными инструментами. Это обусловлено тем, что последовательность аминокислотных остатков задается принципиально разными кодами. Генетический код биосинтеза белка основан на комплементарности нуклеиновых оснований и аминокислот и в взаимодействии белок — нуклеиновая кислота.

Последовательность аминокислотных остатков в нерибосомальном биосинтезе пептидов определяется последовательностью аминокислотных остатков самих синтетаз, которые, в свою очередь, являются продуктами трансляции соответствующих генов [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Hancock R. E. W., Chapple D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 6: 1317—1323.
2. Grünznewald Y., Marahiel M. A. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Revs* 2006; 70: 1: 121—146.
3. Strieker M., Marahiel M. A. The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics. *Chem Biochem* 2009; 10: 4: 607—616.
4. Булгакова В. Г., Орлова Т. И., Полин А. Н. Устойчивость актиномицетов — продуцентов к собственным антибиотикам. *Антибиотики и химиотер* 2010; 55: 1—2: 42—49.
5. Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. I. Нерибосомальные антибиотики полипептиды. *Антибиотики и химиотер* 2011; 56: 3—4: 57—68.
6. Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. II. Нерибосомальные пептиды различного биологического действия. *Антибиотики и химиотер* 2011; 56: 11—12.
7. Stein T., Vater J., Krufi V. et al. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem* 1996; 271: 26: 15428—435.

При рибосомальном биосинтезе мРНК, связанная с рибосомой, содержит информацию о последовательности аминокислотных остатков в виде триплетов нуклеотидов, которые являются антикодонами для аминоацил-т-РНК (для каждой аминокислоты свой антикодон). Происходит перевод с «языка нуклеотидов» на «язык аминокислот».

При нерибосомальном биосинтезе 10 значимых аминокислотных остатков «кармана» представляют собой аналог кодона. Антикодоном в данном случае являются свободные субстратные аминокислоты, поступившие в «карман» и (в соответствии с их структурой и структурой значимых аминокислот) задерживаются в нём, активируются и переносятся белком-переносчиком к месту образования пептидной связи.

Таким образом, в отличие от рибосомального биосинтеза при нерибосомальном не требуются молекулярные адапторы (аминоацил-т-РНК), поскольку процесс происходит на «языке аминокислот».

Конечными продуктами рибосомального биосинтеза являются белки, которые играют первостепенную роль в структурах и функциях клетки.

Молекулярная масса белков колеблется в пределах 6000—1000000. Белки представляют собой молекулярный инструмент, с помощью которого реализуется генетическая информация.

Конечными продуктами нерибосомального пептидного синтеза являются пептиды достаточно невысокого молекулярного веса, часто циклические структуры. В состав пептидов входят кроме «белковых» и «небелковые» аминокислоты, а также непептидные фрагменты. Все это способствует разнообразию синтезируемых структур. Эти продукты считаются вторичными метаболитами. Их роль в жизнедеятельности самого микроорганизма-продуцента недостаточно ясна, но их участие в экологии и коммуникационных взаимодействиях весьма вероятно.

Однако два представленные типа биосинтеза пептидных соединений не являются альтернативными.

8. Lipmann F., Gevers W., Kleinkauf H. et al. The enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Adv Enzimol* 1971; 35: 1–34.
9. Laland S. G., Zimmer T. L. The protein thiotemplate of mechanism of synthesis for the peptide antibiotics produced by *Bacillus brevis*. *Essays Biochem* 1973; 9: 31–57.
10. Karahashi K. Biosynthesis of small peptides. *Annu Rev Biochem* 1974; 43: 445–459.
11. Conti E., Stachelhaus T., Marahiel M. A., Brick P. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J* 1997; 16: 4174–4183.
12. Lautru S., Challis G. L. Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* 2004; 150: 6: 1629–1636.
13. Hahn M., Stachelhaus T. Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 44: 15585–15590.
14. Stachelhaus T., Mootz H. D., Marahiel M. A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* 1999; 6: 8: 493–505.
15. Wu C.-Y., Chen C.-L., Lee Y.-C. et al. Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases. *J Biol Chem* 2007; 282: 8: 5608–5621.
16. Chiochini C., Linne U., Stachelhaus T. In vivo biocombinatorial synthesis of lipopeptides by COM domain-mediated reprogramming of the surfactin biosynthetic complex. *Chem Biol* 2006; 13: 8: 899–908.
17. Stachelhaus T., Mootz H. D., Bergendahl V., Marahiel M. A. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* 1998; 273: 35: 22773–22781.
18. Kraas F. I., Helmetag V., Wittmann M. et al. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem Biol* 2010; 17: 8: 872–880.
19. Lee T. V., Johnson L. J., Johnson R. D. et al. Structure of eukaryotic nonribosomal peptide synthetase adenylation domain that activates a large hydroxamate amino acid in siderophore biosynthesis. *J Biol Chem* 2009; 285: 4: 2415–2431.
20. Li J., Jensen S. E. Nonribosomal biosynthesis of fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 involves direct activation of a D-amino acid. *Chem Biol* 2008; 15: 2: 118–127.
21. Tang G.-L., Cheng Y.-Q., Shen B. Chain initiation in the leinamycin-producing hybrid nonribosomal peptide/polyketide synthetase from *Streptomyces atroolivaceus* S-140. Discrete, monofunctional adenylation enzyme and peptidyl carrier protein that directly load D-alanine. *J Biol Chem* 2007; 282: 28: 20273–20285.
22. Conti E., Franks N. P., Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throw light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* 1996; 4: 287–298.
23. Li L., Deng W., Song J. et al. Characterization of the saframycin A gene cluster from *Streptomyces lavendulae* NRRL 11002 revealing a nonribosomal peptide synthetase system for assembling the unusual tetrapeptidyl skeleton in an iterative manner. *J Bacteriol* 2008; 190: 1: 251–263.
24. von Döhren H., Dieckmann R., Pavela-Vrancic M. The nonribosomal code. *Chem Biol* 1999; 6: R273–R279.
25. Dieckmann R., Pavela-Vrancic M., Kleinkauf H., von Döhren H. Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase. *J Mol Biol* 1999; 288: 129–140.
26. Challis G. L., Ravel J., Tompsend C. A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* 2000; 7: 3: 211–224.
27. Belshaw P., Walsh C. T., Stachelhaus T. Aminoacyl-CoAs as a probe of condensation domain selectivity in nonribosomal synthesis. *Science* 1999; 284: 486–489.
28. Balibar C. J., Vallancourt F. H., Walsh C. T. Generation of D amino acid residues in arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem Biol* 2005; 12: 11: 1189–1200.
29. Schneider T. L., Shen B., Walsh C. T. Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. *Biochemistry* 2003; 42: 32: 9722–9730.
30. Kessler N., Schuhmann H., Mornweg S. et al. The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J Biol Chem* 2004; 279: 9: 7413–7419.
31. Duitman E. H., Hamoen L. W., Rembold M. et al. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Nat Acad Sci* 1999; 96: 23: 13294–13299.
32. Trauger J. W., Kohli R. M., Walsh C. T. Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 2001; 40: 24: 7092–7098.
33. Robbel L., Hoyer K. M., Marahiel M. A. TioS-T-TE — a prototypical thioesterase responsible for cyclodimerization of the quinoline- and quinoxaline-type class of chromodopsipeptides. *FEBS J* 2009; 276: 6: 1641–1653.
34. Hoyer K. M., Mahiert C., Marahiel M. A. The iterative gramicidin S thioesterase catalyzed peptide ligation and cyclization. *Chem Biol* 2006; 14: 1: 13–22.
35. Tseng C. C., Bruner S. D., Kohli R. M. et al. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry*. 2002; 41: 45: 13350–13359.
36. Kato H., Tsuji K., Harada K. Microbial degradation of cyclic peptides produced by bacteria. *Microbial degradation of cyclic peptides*. *J Antibiot* 2009; 62: 4: 181–190.
37. Ridley C. P., Lee H. Y., Khosla C. Evolution of polyketide synthases in bacteria. *PNAS* 2007; 105: 12: 4595–4600.
38. Tsuge K., Inoue S., Ano T. et al. Horizontal transfer of iturin A operon, itu, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 11: 4541–4648.
39. Lawrence D. P., Kroken S., Pryor B. M., Arnold A. E. Interkingdom gene transfer of a hybrid NPS/PKS from bacteria to filamentous *Ascomycota*. *PLoS One* 2011; 6: 11: e28231.
40. Шестakov С. В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий. *Экологическая генетика* 2007; 5: 2: 12–24.
41. Walsh C. T. Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chem BioChem* 2002; 3: 2–3: 124–134.
42. Du L., Shen B. Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001; 4: 2: 215–228.
43. Shen B., Du L., Sanchez C. et al. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001; 27: 6: 378–385.
44. Shen B., Du L., Sanchez C. et al. Cloning and characterization of the bleomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *J Nat Prod* 2002; 65: 3: 422–431.
45. Doekel S., Coëffet-LeGal M.-F., Gu J.-Q. et al. Non-ribosomal peptide synthetase module fusions to produce derivatives of daptomycin in *Streptomyces roseosporus*. *Microbiology* 2008; 154: 9: 2872–2880.
46. Miao V., Coëffet-LeGal M.-F., Brian P. et al. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* 2005; 151: 5: 1507–1523.
47. Müller C., Nolden S., Gabhardt P. et al. Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the lipopeptide antibiotic friulimycin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3: 1028–1037.
48. Guenzi E., Galli G., Grgurina I. et al. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J Biol Chem* 1998; 273: 49: 32857–32863.
49. Zhang J. H., Quigley N. B., Gross D. C. Analysis of the syrB and syrC genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. *J Bacteriol* 1995; 177: 14: 4009–4020.
50. Kaysser L., Tang X., Wemakor E. et al. Identification of a napsamycin biosynthesis gene cluster by genome mining. *Chem BioChem* 2011; 12: 477–487.
51. Cheng Y.-Q., Yang M., Matter A. M. Characterization of a gene cluster responsible for the biosynthesis of anticancer agent FK228 in *Chromobacterium violaceum* No.968. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 11: 3460–3469.
52. Wesener S. R., Potharia V. Y., Cheng Y.-Q. Reconstitution of the FK228 biosynthetic pathway reveals cross talk between modular polyketide synthases and fatty acid synthase. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 4: 1501–1507.
53. Cheng Y.-Q., Tang G.-L., Shen B. Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam

- leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. J Bact 2002; 184: 24: 7013—7024.
54. Tang G-L., Cheng Y-Q., Shen B. Leinamycin biosynthesis revealing unprecedented architectural complexity for a hybrid polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase. Chem Biol 2004; 11: 1: 33—45.
55. Katz E., Weissbach H. Biosynthesis of the actinomycin chromophore. Enzymatic conversion of 4-methyl-3-hydroxy-antranilic acid to actinocin. J Biol Chem 1962; 237: 882—886.
56. Keller U., Lang M., Crnovcic I. et al. The actinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces chrysomallus*: a genetic hall of mirrors for synthesis of a molecule with mirror symmetry. J Bacteriol 2010; 192: 10: 2583—2595.
57. Foster I. J. W., Katz E. Control of actinomycin D biosynthesis in *Streptomyces parvulus*: regulation of tryptophan oxygenase activity. J Bacteriol 1981; 148: 3: 670—677.
58. Perlman D., Otani S., Perlman K., Walker V. 7-Hydroxy-4-methyl-kynurenin as an intermediate in actinomycin biosynthesis. J Antibiot 1973; 26: 5: 289—296.
59. Schmidt-Kastner G. Über neue biosynthetische actinomycine. Medizin und chemie 1956; 5: 463—476.
60. Егоров Н. С., Силаев А. Б., Камруха Г. С. и др. Антибиотики-полипептиды. 1987; 159—204.
61. Шапошников В. Н., Нефелова М. В., Орлова Т. И. и др. Образование новых фракций аурантина и изучение их химических и биологических свойств. ДАН 1962; 147: 6: 1476—1479.
62. Соколов Ю. Н., Кучкарев Р. Н. Отчет о результатах кооперированного клинического изучения нового противоракового антибиотика актиноленина (Ау₇) В кн. Химиотерапия опухолей в СССР. 1972; 15—16: 105—113.
63. Mason K., Katz E., Mauger A. Studies on the biological activities of actinomycins Z₁ and Z₅. Arch Biochem Biophys 1974; 160: 2: 402—411.
64. Arai T., Yazawa K., Takahashi K. et al. Directed biosynthesis of new saframycin derivatives with resting cells of *Streptomyces lavendulae*. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 1: 5—11.
65. Eppelmann K., Doekel S., Marahiel M. A. Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. J Biol Chem 2001; 276: 37: 34824—34831.
66. Gruenewald S., Mootz H. O., Stehmetz P., Stachelhaus T. In vivo production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 6: 3282—3291.
67. de Ferra F., Rodrigues F., Tortora O. et al. Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. J Biol Chem 1997; 272: 40: 25304—25309.
68. Grünewald J., Sieber S. A., Mahlert C. et al. Synthesis and derivatization of daptomycin: a chemoenzymatic route to acidic lipopeptide antibiotics. J Amer Chem Soc 2004; 126: 51: 17025—17031.
69. Grünewald J., Sieber S. A., Marahiel M. A. Chemo- and regioselective peptide cyclization triggered by the N-terminal fatty acid chain length: the recombinant cyclase of the calcium-dependent antibiotic from *Streptomyces coelicolor*. Biochemistry 2004; 43: 10: 2915—2925.
70. Alexander D. C., Rock J., He X. et al. Development of a genetic system for combinatorial biosynthesis of lipopeptides in *Streptomyces fradiae* and heterologous expression of the A54145 biosynthesis gene cluster. Appl Environ Microbiol 2010; 76: 20: 6877—6887.
71. Nguyen K. T., He X., Alexander D. C. et al. Genetically engineered lipopeptide antibiotics related to A54145 and daptomycin with improved properties. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 4: 1404—1413.
72. Nguyen K. T., Ritz D., Gu J-Q. et al. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. PNAS 2006; 103: 46: 17462—17467.

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПЕПТИД ДЕФОРМИЛАЗЫ И СОВМЕСТНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ: КОМБИНАЦИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.

NEW PEPTIDE DEFORMYLASE INHIBITORS AND COOPERATIVE INTERACTION: A COMBINATION TO IMPROVE ANTIBACTERIAL ACTIVITY / E. GOEMAERE, A. MELET, V. LARUE, A. LIEUTAUD, R. ALVES DE SOUSA, J. CHEVALIER, L. YIMGA-DJAPA, C. GIGLIONE, F. HUGUET, M. ALIMI, T. MEINNEL, F. DARDEL, I. ARTAUD, J.-M. PAGÈS*// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2012; 67: 6: 1392—1400.

Лекарственная устойчивость бактерий — проблема здравоохранения, вызывающая беспокойство, требующая исследований и разработок новых антибиотиков. Пептид деформилаза (ПДФ) представляет в настоящее время хорошо описанную внутриклеточную мишень, избранную для создания новой группы антибиотиков, ингибиторов ПДФ (ИПДФ). Исходная чувствительность бактерий к ингибитору цитоплазматической мишени прямо связана с диффузией соединения через мембранный барьер грамотрицательных бактерий и его аккумуляцией в цитозоле до требуемой концентрации. Предварительно было показано, что активность различных ИПДФ в большой степени зависит от накопления активных молекул веществ, повышающих проницаемость, подавляющих помповый выброс, а также проявляется в мутантах с нарушенным механизмом выброса. В данной работе были оценены различные комбинации с использованием предполагаемых ингибиторов (ИПДФ, ингибиторы метионин аминоксептидазы и т. д.) для повышения антибиотической активности в отношении различных устойчивых грамотрицательных бактерий. Максимальный эффект наблюдали у комбинации актиномина с ингибитором двойного действия — ингибитором метионин аминоксептидазы и ПДФ, молекула которого способна взаимодействовать с вышеуказанной мишенью, когда актинонин связан с активным центром ПДФ. Подобная комбинация ингибиторов, действующих на близкие метаболические стадии, приводит в результате к объединённому действию на бактериальные клетки и тем самым открывает новый путь для преодоления мультилекарственной устойчивости бактерий.

* UMR-MD1, Transporteurs Membranaires, Chimiorésistance et Drug Design, Faculté de Médecine, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

АДЖОИН, ОБОГАЩЁННОЕ СЕРОЙ СОЕДИНЕНИЕ ИЗ ЧЕСНОКА, ПОДАВЛЯЕТ ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЕМЫЕ КВОРУМ СЕНСИНГОМ.

AJOENE, A SULFUR-RICH MOLECULE FROM GARLIC, INHIBITS GENES CONTROLLED BY QUORUM SENSING / T. H. JAKOBSEN, M. VAN GENNIP, R. K. PHIPPS, M. S. SHANMUGHAM, L. D. CHRISTENSEN, M. ALHEDE, M. E. SKINDERSOE, T. B. RASMUSSEN, K. FRIEDRICH, F. UTHE, P. Ø. JENSEN, C. MOSER, K. F. NIELSEN, L. EBERL, T. O. LARSEN, D. TANNER, N. HØIBY, T. BJARNSHOLT, M. GIVSKOV*// ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 2012; 56: 5: 2314—2325.

Следует ожидать, что в связи с появлением бактерий с мультилекарственной устойчивостью, приоритетной областью исследований станет разработка новых антибиотиков и стратегий лечения инфекций. Кворум сенсинг (КС), коммуникационная система патогенных бактерий, подобных *Pseudomonas aeruginosa*, синхронизирующая экспрессию специфических генов, определяющих патогенность, является возможной мишенью лекарств. Предшествующими исследованиями *in vitro* и *in vivo* было установлено, что грубый экстракт чеснока значительно подавляет КС *P. aeruginosa*. С помощью биологически контролируемого фракционирования экстракта чеснока был определён основной ингибитор КС — аджоин, серусодержащее соединение, обладающее потенциалом антибактериального соединения. Обширными исследованиями *in vitro* и *in vivo* было определено действие синтетического аджоина на *P. aeruginosa*. Исследования с помощью микрочипов ДНК, обработанных аджоином культур *P. aeruginosa*, выявили зависимое от концентрации ослабление некоторых основных контролируемых КС факторов вирулентности, включая рамнолипид. Более того, обработка *in vitro* биоплёнок аджоином показала чёткий синергидный с тобрамицином эффект, вызывающий гибель биоплёнки и прекращение литического некроза полиморфноядерных лейкоцитов. На модели лёгочной инфекции мышей обработка аджоином приводила к значительному очищению от *P. aeruginosa* животных по сравнению с контрольными необработанными животными. Настоящее исследование дополняет список примеров, демонстрирующих возможности соединений, нарушающих КС, в лечении бактериальных инфекций.

* Department of International Health, Immunology and Microbiology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

* Singapore Centre on Environmental Life Sciences Engineering, Nanyang Technological University, Singapore, Singapore.

**СИНЕРГИДНОЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ
РАННЕГО КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ
ТОБРАМИЦИНОМ И ИНГИБИТОРАМИ КВОРУМ
СЕНСИНГА ИНТРАПАРЕНТЕРАЛЬНОЙ МОДЕЛЬНОЙ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA ИНФЕКЦИИ
ИНОРОДНОГО ТЕЛА У МЫШЕЙ.**

**SYNERGISTIC ANTIBACTERIAL EFFICACY OF EARLY
COMBINATION TREATMENT WITH TOBRAMYCIN
AND QUORUM-SENSING INHIBITORS AGAINST
PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN AN
INTRAPERITONEAL FOREIGN-BODY INFECTION MOUSE
MODEL / L. D. CHRISTENSEN, M. VAN GENNIP,
T. H. JAKOBSEN, M. ALHEDE, H. P. HOUGEN, N. HØIBY,
T. BJARNSHOLT, M. GIVSKOV*// JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2012; 67: 5:
1198—1206.**

Образованные *in vitro* биоплёнки *Pseudomonas aeruginosa*, дефицитные по кворум сенсингу (КС), более чувствительны к тобрамицину, чем биоплёнки *P. aeruginosa* с полноценным КС. Комбинированная обработка ингибиторами КС (ИКС) и тобрамицином показала синергидное бактерицидное действие на биоплёнки *in vitro*. Полученные данные были проверены в условиях *in vivo* на модельной *P. aeruginosa* инфекции инородного тела с образованием биоплёнки. Сравнивали эффект профилактического лечения и лечения, начатого спустя 11 дней после инфицирования. Силиконовые трубчатые имплантаты предварительно колонизированные *P. aeruginosa* вводили в брюшную полость BALB/с мышей. Мышей лечили в/б или п/к инъекциями фуранона С-30 ИКС, аджоинон или экстрактом из сока хрена в комбинации с тобрамицином. Через 1, 2, 3 и 14 дней после инфицирования производили количественную оценку состояния мышей по бактериологическим, гистопатологическим показателям и определению цитокинов. Комбинированное лечение в случае всех испытанных ИКС приводило к значительному снижению КОЕ/имплантат по сравнению с группами плацебо. При раннем начале лечения наблюдались существенные различия в клиренсе между группами комбинированного и некомбинированного лечения и группами некомбинированного лечения и плацебо. В одном случае отмечены различия между двумя группами некомбинированного лечения. Таким образом, при лечении мышей комбинацией ИКС и тобрамицина может быть достигнут синергидный антибиотический эффект, что приводит к увеличению клиренса *P. aeruginosa* на модели инфекции инородного тела. Результаты исследования проясняют важные перспективы в деле разработки стратегии раннего комбинированного лечения хронических инфекций.

* Department of International Health, Immunology and Microbiology, Faculty of Health Sciences,

University of Copenhagen, DK-2200 Copenhagen, Denmark.

**ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОГО ФТОРЦИКЛИНОВОГО
АНТИБИОТИКА TP-434 ПО МЕСТУ СВЯЗЫВАНИЯ
И МЕХАНИЗМАМ УСТОЙЧИВОСТИ.**

**TARGET- AND RESISTANCE-BASED MECHANISTIC
STUDIES WITH TP-434, A NOVEL FLUOROCYCLINE
ANTIBIOTIC / T. H. GROSSMAN*, A. L. STAROSTA,
C. FYFE, W. O'BRIEN, D. M. ROTHSTEIN,
A. MIKOLAJKA, D. N. WILSON, J. A. SUTCLIFFE//
ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 2012;
56: 5: 2559—2564.**

TP-434 — новый широкого спектра действия фторциклиновый антибиотик, активный в отношении бактерий, обладающих основными механизмами устойчивости к антибиотикам, включая специфические для тетрациклинов помповый выброс и защиту рибосом. Механизм действия TP-434 оценивали на клетках и методами *in vitro*. У клеток *Escherichia coli* с рекомбинантными генами устойчивости к тетрациклину значения МПК TP-434 (0,063 мкг/мл) не менялись при наличии tet(M), tet(K) и tet(B), но возрастали до 0,25 и 4 мкг/мл в присутствии tet(A) и tet(X) соответственно. В присутствии любого из этих механизмов устойчивости активность тетрациклина в отношении клеток *E. coli* была значительно ниже (МПК $\geq$ 128 мкг/мл). TP-434 продемонстрировал *in vitro* подавление транскрипции/трансляции (50% ингибиторная концентрация $[IC_{50}] = 0,29 \pm 0,09$ мкг/мл) и конкуренцию с $[^3H]$ -тетрациклином ($IC_{50} = 0,22 \pm 0,07$ мкМ) в связывании с рибосомами. Антибиотическая активность TP-434 и других испытанных представителей класса тетрациклинов в отношении штаммов *Propionibacterium acnes*, несущих мутацию в 16S рРНК, G1058C, модификацию, меняющую конформацию сайта, связывающего тетрациклин в рибосоме, снижалась в 4—16 раз по сравнению с активностью в отношении контрольного дикого штамма. Суммированные результаты подтверждают вывод о том, что TP-434, подобно другим тетрациклинам, связывается с рибосомами и подавляет синтез белка, но его активность в значительной степени не подвержена действию общих механизмов устойчивости к тетрациклинам.

* Tetrphase Pharmaceuticals, Inc., Watertown, Massachusetts, USA.

**«ИЗЛЕЧИВАНИЕ» БАКТЕРИЙ
ОТ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ:
«ВОЗВРАЩЁННЫЕ» АНТИБИОТИКИ,
НОВЫЙ КЛАСС ПРИРОДНЫХ АНТИБИОТИКОВ.**

CURING BACTERIA OF ANTIBIOTIC RESISTANCE: REVERSE ANTIBIOTICS, A NOVEL CLASS OF ANTIBIOTICS IN NATURE / K. HIRAMATSU*, M. IGARASHI, Y. MORIMOTO, T. BABA, M. UMEKITA, Y. AKAMATSU//INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2012; 39: 6: 478—485.

В результате скрининга культур почвенных бактерий был вновь «открыт» старый антибиотик (нибомицин) с новыми чертами. Нибомицин был активен в отношении хинолоноустойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* с мутированными *gyrA* генами, но не в отношении чувствительных к хинолоновым антибиотикам штаммов с интактными *gyrA* генами. Устойчивые к нибомицину мутантные штаммы были получены из хинолоноустойчивого, нибомициночувствительного VISA *S. aureus* штамма Mu50. Обратные мутации в *gyrA* генах, приводящие к утрате устойчивости к хинолонам, происходили с чрезвычайно низкой частотой ($<1 \times 10^{-11}$ /поколение). Таким образом, описанный нибомицин является первым представителем нового класса антибиотиков, названных «возвращёнными».

* Department of Bacteriology, Juntendo University, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan.

АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ АНАЭРОБОВ НОВОГО ИНГИБИТОРА БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ, NXL104, В КОМБИНАЦИИ С БЕТАЛАКТАМАМИ И МЕТРОНИДАЗОЛОМ.

ANTI-ANAEROBIC ACTIVITY OF A NEW β -LACTAMASE INHIBITOR NXL104 IN COMBINATION WITH β -LACTAMS AND METRONIDAZOLE / L. J. DUBREUIL*, S. MAHIEUX, C. NEUT, C. MIOSSEC, J. PACE//INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2012; 39: 6: 500—504.

Новый ингибитор бета-лактамаз, NXL104, подавляет бета-лактамазы классов А и С. Проведена оценка активности NXL104 в комбинации с цефалоспорином III поколения, цефтазидимом (CAZ) и цефтриаксоном (CRO), или пиперациллином (PIP) в отношении 316 анаэробных бактерий. Значения МПК определяли методом разведения в агаре. Ингибиторы бета-лактамаз, NXL104 или тазобактам, добавляли к беталактамам в фиксированной концентрации, равной 4 мг/л. Испытывали также тройную комбинацию, содержащую NXL104 и CAZ с метронидазолом (MTZ) в соотношении 8:1. Активность комбинаций CAZ, CRO и PIP с NXL104 в отношении многих бактерий увеличивалась. Значения МПК (МПК₅₀) комбинации CAZ + NXL104 в отношении грамотрицательных анаэробов были в 8—16

раз ниже значений CAZ. Показатели устойчивости всех анаэробных штаммов составили: CAZ — 37,7%; CRO — 31%; CAZ + NXL104 — 15,2%; CRO + NXL104 — 5,4%; и MTZ — 4,1%. Не были обнаружены устойчивые штаммы к комбинациям: PIP + TAZ, PIP + NXL104 и к тройной комбинации MTZ + CAZ + NXL104. Итак, тройная комбинация MTZ + CAZ + NXL104 продемонстрировала высокую активность в отношении самых важных клинических видов анаэробов, что отвечает требованиям при лечении полимикробных инфекций, а комбинация CAZ + NXL104 была высокоактивна в отношении бета-лактамазообразующих Enterobacteriaceae и *Pseudomonas aeruginosa*. В настоящее время она проходит 2-ю фазу клинических испытаний по лечению осложнённых интраабдоминальных инфекций.

* Faculty of Pharmacy, Université of Lille 2, Lille, France.

ПОИСК С ПОМОЩЬЮ БАЗЫ ДАННЫХ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ IN VIVO АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО STAPHYLOCOCCUS AUREUS USA300.

DATABASE SCREENING AND IN VIVO EFFICACY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS USA300 / J. MENOUSEK, B. MISHRA, M. L. HANKE, C. E. HEIM, T. KIELIAN, G. WANG*//INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2012; 39: 5: 402—406.

Природные антимикробные пептиды (АМП) являются многообещающими кандидатами для разработки нового поколения антибиотиков в ответ на появление таких антибиотикоустойчивых патогенов, как метициллиноустойчивый *Staphylococcus aureus* (MRSA). Для облегчения поиска новых кандидатов была использована База данных Антимикробных пептидов (APD), содержащая природные АМП из бактерий, грибов, растений и животных. В результате скрининга из 30 пептидов, отобранных из APD, были идентифицированы новые кандидаты, активные в отношении MRSA. Эти пептиды состояли из менее чем 25 аминокислотных остатков, не содержали цистеин, имели катионную природу и были выделены из различных источников, как-то бактерий, насекомых, паукообразных, оболочников, амфибий, рыб, млекопитающих. Шесть пептидов, включая аскафин-8, АМП-1 (DASamP1), DASamP2, ликотоксин I, макулатин 1.3 и писцидин I, обладали сильной антибиотической активностью в отношении MRSA штамма USA300. Пять из 6 пептидов обладали широким антибактериальным спек-

ктом действия. АМП-1, оказывая бактерицидное действие на MRSA, не подавлял *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa*, но вместе с тем подавлял раннее образование биоплёнок на катетеро-зависимой модели MRSA-инфекции у мышей. АМП-1 представляет собой новый, с короткой цепью и высокоактивный пептид, полезный как исходный образец для создания новых анти-MRSA пептидов.

* Department of Microbiology and Pathology, University of Nebraska Medical Center, 986495 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-6495, USA.

ЦЕРИЙ, ХИТОЗАН И ХАМАМЕЛИТАННИН В КАЧЕСТВЕ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ БИОПЛЁНОК.

CERIUM, CHITOSAN AND HAMAMELITANNIN AS
NOVEL BIOFILM INHIBITORS? / L. COBRADO*,
M. M. AZEVEDO, A. SILVA-DIAS, J. PEDRO RAMOS,
C. PINA-VAZ, A. G. RODRIGUES // JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2012;
67: 5: 1159—1162.

Колонизация вводимых внутрь медицинских приспособлений и последующее образование биоплёнки представляет глобальную проблему, поскольку приводит к персистенции инфекции и способствует развитию устойчивости к антибиотикам. Целью исследования было определить антибиотическую активность нитрата церия (НЦ), хитозана и хамамелитаннина (ХМТ) в отношении обычных продуцентов биоплёнки и оценить их эффективность в подавлении образования биоплёнки на примере полиуретаноподобного (ПУР) катетера. Определяли антибиотическую активность НЦ, низкомолекулярного хитозана (НМХ) и ХМТ и их способность подавлять образование биоплёнки штаммами *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* и *Candida albicans*. Образование биоплёнки оценивали по сегментам ПУР катетера, а метаболическую активность — колориметрически по восстановлению тетразолия. НЦ и НМХ подавляли рост всех испытанных микробных штаммов, у ХМТ активность отсутствовала. Что касается образования биоплёнки на ПУР катетере: в субингибиторных концентрациях НЦ значительно подавлял метаболическую активность *C.albicans*; НМХ снижал метаболическую активность *S.epidermidis* и *C.albicans*; а ХМТ — метаболическую активность всех испытанных бактерий, но не дрожжей. Итак, была продемонстрирована бактерицидная активность НЦ и НМХ, а также фунгистатическое действие при более низких концентрациях. ХМТ значительно снижал метаболическую активность всех испытанных бак-

терий. Указанные ингибиторы бактерий могут сыграть важную роль при применении различных биомедицинских устройств.

* Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal.

ТИГЕЦИКЛИН В СУБИНГИБИТОРНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ *IN VITRO* НАРУШАЕТ РАЗВИТИЕ БИОПЛЁНКИ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.

IN VITRO INTERFERENCE OF TIGECYCLINE
AT SUBINHIBITORY CONCENTRATIONS ON BIOFILM
DEVELOPMENT BY *ENTEROCOCCUS FAECALIS* /
J. R. MAESTRE, L. AGUILAR*, M. MATEO,
M.-J. GIMÉNEZ, M.-L. MÉNDEZ, L. ALOU,
J.-J. GRANIZO, J. PRIETO // JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY
2012; 67: 5: 1155—1158.

Для *Enterococcus faecalis* характерно образование биоплёнок. Задачей исследования было количественно оценить влияние субингибиторных концентраций тигециклина на образование биоплёнки 20 штаммами *E.faecalis*, имеющими значение МПК тигециклина от 0,12 (8 штаммов) до 0,25 мг/л (12 штаммов). Определение проводили спектрофотометрически по оптической плотности при 450 нм (OD_{450}) после окрашивания кристаллическим фиолетовым. Бактерии культивировали на бульоне с триптическим переваром сои с добавлением 1% глюкозы, свободном от антибиотика или содержащем субингибиторные концентрации тигециклина (0,25МПК или 0,5МПК, что аналогично концентрации в сыворотке или толстой кишке после введения стандартной дозы). В присутствии субингибиторных концентраций тигециклина обобщённые значения OD_{450} для 20 штаммов были значительно ниже контрольных значений на среде без антибиотика: 0,468 (0,379—0,516) в контроле против 0,295 (0,200—0,395) при 0,25МПК ($p<0,001$) и 0,287 (0,245—0,479) при 0,5МПК ($p<0,001$) при значительных различиях между обобщёнными значениями OD_{450} , полученными с каждой концентрацией антибиотика ($p=0,022$). У 17 из 20 (85%) штаммов значения OD_{450} , полученные при 0,25МПК тигециклина, были существенно ниже ($p<0,05$), чем базовое значение OD_{450} , тогда как при 0,5МПК такое наблюдалось у 12 из 20 (60%) штаммов. Таким образом, *in vitro* тигециклин в субингибиторных концентрациях нарушает образование биоплёнки *E.faecalis*.

* Microbiology Department, School of Medicine, Universidad Complutense, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.

ПОДАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОПЛЁНКИ И «РОЯЩЕЙСЯ» ПОДВИЖНОСТИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ СИНТЕТИЧЕСКИМИ КАТИОННЫМИ ПЕПТИДАМИ.

INHIBITION OF BACTERIAL BIOFILM FORMATION AND SWARMING MOTILITY BY A SMALL SYNTHETIC CATIONIC PEPTIDE / C. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, V. KOROLIK, M. BAINS, U. NGUYEN, E. B. M. BREIDENSTEIN, S. HORSMAN, S. LEWENZA, L. BURROWS, R. E. W. HANCOCK* // ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY MAY 2012; 56: 5: 2696—2704.

Биоплёнки образуются в 80% инфекций и трудно поддаются лечению из-за более высокой мультилекарственной устойчивости по сравнению с планктонными клетками. На основании наблюдения о блокировании образования биоплёнки пептидом человека LL-37 при концентрациях ниже МПК был проведён скрининг низкомолекулярных пептидов, обладающих антиплёночной активностью, и идентифицирован новый синтетический катионный пептид 1037, содержащий только 9 аминокислотных остатков. Пептид 1037 обладал слабой антибактериальной активностью, но в концентрации, равной 1/30 МПК, эффективно предотвращал образование биоплёнки (снижение клеточной биомассы более чем на 50%) грамотрицательных патогенов, *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cenocepacia*, и грамположительной *Listeria monocytogenes*. С помощью проточной системы культивирования клеток и широкоугольного флуоресцентного микроскопа было показано, что пептид 1037 значительно снижал образование биоплёнки и вызывал гибель клеток в биоплёнке. Исследования микрочипами и отдалённые результаты показали, что в случае *P. aeruginosa* происходит прямое подавление биоплёнки за счёт уменьшения плавающих и «роящихся» подвижных клеток и стимулирования «судорожной» подвижности, а также подавления экспрессии разнообразных генов, причастных к образованию плёнки (например, PA2204). Сравнение данных (полученных с помощью микрочипов) для клеток, обработанных пептидами LL-37 и 1037, сделало возможным идентифицировать 11 общих генов *P. aeruginosa*, играющих роль в образовании биоплёнки, и предположить функциональные мишени данных пептидов. Пептид 1037 представляется перспективным терапевтическим средством для лечения хронических рецидивирующих инфекций, сопровождающихся образованием биоплёнок и вызванных различными бактериями.

* Centre for Microbial Diseases and Immunity Research, Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, Canada.

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ РОЛЬ ФИЗИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И ПЛОТНОСТИ КЛЕТОК, НАХОДЯЩИХСЯ В БИОПЛЁНКЕ, В ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ.

THE RELATIVE CONTRIBUTIONS OF PHYSICAL STRUCTURE AND CELL DENSITY TO THE ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA IN BIOFILMS / A. E. KIRBY, K. GARNER, B. R. LEVIN* // ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY JUNE 2012; 56: 6: 2967—2975.

Продолжительность лечения многих бактериальных инфекций, а в некоторых случаях и его успех, определяют ненаследуемые механизмы устойчивости. К наиболее важным ненаследуемым механизмам устойчивости относится способность бактерий образовывать биоплёнки. Доказано, что бактерии в биоплёнках более устойчивы к антибиотикам, чем планктонные клетки. Неясно, однако, от чего больше зависит устойчивость — от структуры биоплёнок или физиологии и плотности бактерий в них. Для выяснения роли структуры биоплёнки в количественном выражении устойчивости был разработан метод сравнительного определения чувствительности бактерий в биоплёнке и клеток, механически высвобожденных из этих структур. Метод был применен к *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* для определения чувствительности к антибиотикам 5 классов, контроля за плотностью и физиологическим статусом обработанных антибиотиками бактерий. Для большинства испытанных антибиотиков бактерии биоплёнок были не более устойчивы планктонным клеткам в той же плотности. Полученные результаты дают основание предположить, что бактерицидное действие гентамицина, стрептомицина и колистина подавляется структурой биоплёнки. Бактерицидность указанных антибиотиков значительно эффективнее в отношении клеток, высвобождаемых из биоплёнки, чем заключённых в её структуру.

* Biology Department, Emory University, Atlanta, Georgia, United States.

УГЛУБЛЕНИЕ ПОНИМАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛИПОГЛИКОПЕПТИДА ТЕЛАВАНЦИНА ЧЕРЕЗ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛОБАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ.

FURTHER INSIGHTS INTO THE MODE OF ACTION OF THE LIPOGLYCOPETIDE TELAVANCIN THROUGH GLOBAL GENE EXPRESSION STUDIES / Y. SONG, C. S. LUNDE, B. M. BENTON, B. J. WILKINSON* // ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY JUNE 2012; 56: 6: 3157—3164.

Телаванцин (ТЛВ), новый полусинтетический липогликопептидный антибиотик, производное ванкомицина с дециламиноэтиловой боковой цепью, активен в отношении грамположительных бактерий, включая штаммы *Staphylococcus aureus*, устойчивые к метициллину или ванкомицину. Двойной механизм действия ТЛВ состоит, предположительно, в подавлении биосинтеза пептидогликана и деполяризации мембраны. Приведены результаты широкого геномного транскрипционного отклика *S. aureus* на ТЛВ, полученного с помощью микрочипов. Короткое (15 мин) воздействие ТЛВ на *S. aureus* вызывало сильную экспрессию стимулона стресса клеточной стенки, что является характерным признаком ингибирования биосинтеза клеточной стенки. В транскриптом, полученном после 60-минутной обработки ТЛВ, дополнительно к индукции стимулона стресса клеточной стенки наблюдалась индукция различных генов, включая *lrgA* и *lrgB*, генов оперона биосинтеза лизина (*dap*), *vraD* и *vraE*, и *hlgC*, которые, как сообщалось, индуцируются известными деполяризующими мембрану и активными в отношении её агентами, в т. ч. карбонил цианид *m*-хлорофенилгидразоном, даптомицином, бацитрацином и другими антимикробными пептидами. Указанные гены или не индуцировались или слабо индуцировались исходным ванкомицином. Предположительно, экспрессия данных генов является ответной реакцией клетки, ведущей к ослаблению и детоксикации таких молекул, а также диагностикумом молекул, деполяризующих мембрану или активных в отношении мембраны. Полученные результаты означают, что ТЛВ вызывает быструю и значительную индукцию стимулона стресса клеточной стенки и, благодаря этому сильное подавление биосинтеза пептидогликана, а также служат доказательствами, подтверждающими его активность в отношении мембраны и её деполяризации, которая проявляется после более продолжительной экспозиции с ТЛВ.

* Microbiology Group, School of Biological Sciences, Illinois State University, Normal, Illinois, USA.

IN VITRO АКТИВНОСТЬ ТЕЛАВАНЦИНА В КОМБИНАЦИИ С КОЛИСТИНОМ В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ.

**IN VITRO ACTIVITY OF TELAVANCIN IN COMBINATION
WITH COLISTIN VERSUS GRAM-NEGATIVE BACTERIAL
PATHOGENS / M. HORNSEY, C. LONGSHAW,
L. PHEE, D. W. WAREHAM*// ANTIMICROBIAL AGENTS
AND CHEMOTHERAPY JUNE 2012; 56: 6: 3080—3085.**

Лечение инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, всё более затруднено из-за распро-

странения устойчивости. В настоящее время врачи рассматривают применение против штаммов с мультилекарственной устойчивостью нетрадиционной комбинированной терапии несколькими препаратами, которая находится в стадии разработки. В данном сообщении приводятся данные по оценке *in vitro* активности нового липогликопептида телаванцина (ТЛВ) в комбинации с колистином (КОЛ) в отношении 13 грамотрицательных штаммов и 66 клинических изолятов. Заметный синергизм в отношении большинства КОЛ-чувствительных энтеробактерий, штаммов *Stenotrophomonas maltophilia* и *Acinetobacter baumannii*, наблюдали, используя методы «шахматной доски» (индекс фракционной ингибиторной концентрации, [FICI], <0,5; индекс пограничной чувствительности, [SBPI], >2) и кривых гибели во времени (>2-log снижения числа жизнеспособных клеток по сравнению с исходным инокуломом на 24 ч). Ограниченный эффект был отмечен для *Pseudomonas aeruginosa* и штаммов, устойчивых к КОЛ. Согласно данным Е-теста и метода разведения в агаре, активность ТЛВ усиливалась относительно низкими концентрациями КОЛ (0,25—0,75 мкг/мл), при этом МПК ТЛВ снижалась с 32 мкг/мл до ≤1 мкг/мл у 35% клинических штаммов. Это доказывает, что комбинация гликопептид—полимиксин может быть полезным терапевтическим приёмом при лечении грамотрицательных инфекций.

* Antimicrobial Research Group, Centre for Immunology and Infectious Disease, Blizard Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University London, London, United Kingdom.

* Division of Infection, Barts and The London NHS Trust, London, United Kingdom.

ТЕРАПИЯ КАРБАПЕНЕМАМИ БАКТЕРИЕМИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ *ESCHERICHIA COLI* ИЛИ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ОБРАЗУЮЩИМИ БЕТА-ЛАКТАМАЗУ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА. РОЛЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЭРТАПЕНЕМУ.

**CARBAPENEM THERAPY FOR BACTEREMIA DUE
TO EXTENDED-SPECTRUM- β -LACTAMASE-PRODUCING
ESCHERICHIA COLI OR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*:
IMPLICATIONS OF ERTAPENEM SUSCEPTIBILITY /
N.-Y. LEE, C.-C. LEE, W.-H. HUANG, KO-C. TSUI,
PO-R. HSUEH*, W.-C. KO// ANTIMICROBIAL AGENTS
AND CHEMOTHERAPY JUNE 2012; 56: 6: 2888—2893.**

В двух медицинских центрах Тайваня было выполнено ретроспективное исследование по оценке клинических характеристик, исходов и факторов риска летальных исходов больных, леченных карба-

пенемами при бактериемии, вызванной образующими бета-лактамазу расширенного спектра (БЛРС) бактериями. Всего был идентифицирован 251 больной, леченный карбапенемами от бактериемии, обусловленной БЛРС-продуцирующими штаммами *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, уровень чувствительности которых к эртапенему (МПК $\leq 0,25$ мкг/мл) составил соответственно 83,8 и 76,4%, к меропенему — 100 и 99,3%, имипенему — 100 и 97,9%. Существенных различий в показателях критического состояния ($p=0,1$) или уровня смертности от сепсиса ($p=0,2$) у больных с бактериемией, обусловленной БЛРС-продуцирующими *K.pneumoniae* (140 штаммов, 55,8%) и *E.coli* (111 штаммов, 44,2%), не было. Как показал мультивариантный анализ причин смертности от сепсиса, независимыми факторами риска были тяжёлая форма сепсиса (odds ratio [OR], 15,9; 95% ДИ, 5,84 до 43,34; $p<0,001$), госпитальная бактериемия (OR, 4,65; 95% ДИ, 1,42 до 15,24; $p = 0,01$) и не чувствительные к эртапенему штаммы (OR, 5,12; 95% ДИ, 2,04 до 12,88; $p=0,001$). Больные, получавшие неадекватную терапию имели более высокий показатель смертности от сепсиса, чем получавшие адекватную терапию, независимо от антибиотика. Инфекции, вызванные чувствительными к эртапенему штаммами (МПК $\leq 0,25$ мкг/мл), ассоциировались с более благоприятным исходом, чем вызванные штаммами, не чувствительными к эртапенему (МПК $> 0,25$ мкг/мл) при лечении карбапенемами. Но при значениях МПК $\leq 0,5$ мкг/мл или $> 0,5$ мкг/мл показатели смертности были сходными ($p=0,8$). Полученные данные подтверждают рациональность современного критерия CLSI 2011 по карбапенемам в отношении Enterobacteriaceae.

* Department of Laboratory Medicine, National Taiwan University Hospital, National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan.

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ И АНАЛИЗ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ФЕНОТИПИЧЕСКИ ГЕТЕРОГЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К КАРБАПЕНЕМАМ, У ACINETOBACTER BAUMANNII.

PREVALENCE AND ANALYSIS OF MICROBIOLOGICAL
FACTORS ASSOCIATED WITH PHENOTYPIC
HETEROGENEOUS RESISTANCE TO CARBAPENEMS
IN ACINETOBACTER BAUMANNII / F. F. CUENCA*,
C. G. SÁNCHEZ, F. J. CABELLERO-MOYANO, J. VILA,
L. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, G. BOU, J. R. BAÑO,
A. PASCUAL//INTERNATIONAL JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2012; 39: 6: 472—477.

Предметом исследования было определение распространённости *Acinetobacter baumannii* с феноти-

пически гетерогенной резистентностью (ФГР) к карбапенемам (колонии в зоне ингибирования) и анализ связи с некоторыми переменными микробиологическими показателями. Штаммы *A.baumannii*, собранные в Испании, анализировали по 1) значениям МПК карбапенемов, 2) гетерорезистентности к карбапенемам, 3) генам, кодирующим бета-лактамазы (*bla* гены); 4) инсерционным последовательностям, 5) инактивации генов, кодирующих порины (CarO, OprD и Opr33-36), и генов, ассоциированных с AdeABC системой выброса (*adeB*, *adeR* и *adeS*). Для детекции генов использовали амплификацию с помощью ПЦР. Показатель ФГР к имипенему был равен 20%, меропенему — 24%. Чувствительность к имипенему наблюдалась у 39% ФГР штаммов. Значения МПК карбапенемов колоний были подобны ($\pm 1 \log_2$ разведения) значениям МПК родительских штаммов. Колонии, растущие в зоне ингибирования, также проявляли ФГР к карбапенемам. Между ФГР и не-ФГР штаммами наблюдали следующие различия: по *blaOXA-58*-типа, 57% против 0%; *oprD*-типа, 96% против 56%; *adeB*, 89% против 94%; *adeR*, 82% против 94%; *adeS*, 82% против 94%; *ISAba2*, 61% против 31%; и *ISAba3*, 57% против 0%. Нарушений в генах, кодирующих порины или систему выброса (*adeB*, *adeR* and *adeS*), не наблюдали. Штаммы *A.baumannii* с ФГР к карбапенемам были широко распространены в Испании. Данный фенотип присутствует как среди штаммов, чувствительных к карбапенемам, так и не чувствительных к ним. Гетерорезистентность не может объяснить ФГР к карбапенемам, которая более родственна персистенции или толерантности к карбапенемам. *blaOXA-58*-типа, *blaOXA-51*-типа, *ISAba2* и *ISAba3* ассоциируются с ФГР к карбапенемам. Инактивация генов, кодирующих порины или относящихся к AdeABC, встречается нечасто.

* University Hospital Virgen Macarena and University of Sevilla, Avda. Sánchez Pizjuán s/n., 41009 Seville, Spain.

ТРЕХМЕРНЫЙ ЭКВИВАЛЕНТ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КОЖИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КОЛОНИЗАЦИИ ACINETOBACTER BAUMANNII.

THREE-DIMENSIONAL HUMAN SKIN EQUIVALENT
AS A TOOL TO STUDY ACINETOBACTER BAUMANNII
COLONIZATION / A. DE BREIJ*, E. M. HAISMA,
M. RIETVELD, A. EL GHALBZOURI, P. J. VAN DEN
BROEK, L. DIJKSHOORN, P. H. NIBBERING//
ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY MAY
2012; 56: 5: 2459—2464.

Acinetobacter baumannii может колонизировать поверхность человеческого тела госпитализирован-

ных больных, откуда может происходить инвазия хозяина и распространение на других больных и в окружающую среду. Эрадикация микроорганизма с кожи больного является важным стратегическим мероприятием по контролю за инфекцией во время эпидемических и эндемических эпизодов. Для изучения колонизации кожи *Acinetobacter* был разработан трёхмерный эквивалент эпидермиса человеческой кожи. Была охарактеризована прилипаемость *A.baumannii* ATCC 19606T и *Acinetobacter junii* RUH2228T, образование биоплёнки на эквиваленте кожи и реакция на указанные бактерии. Была оценена также способность дезинфектанта хлоргексидина деколонизировать кожные эквиваленты. Как показали результаты, оба штамма на 72 ч реплицировались в роговичном слое, но не проникали в эпидермис. *A.baumannii*, в отличие от *A.junii*, формировал крупные колонии на роговичном слое. Бактериальная колонизация не влияла на активацию кератиноцитов, пролиферацию, дифференциацию и не индуцировала сильной воспалительной реакции. Дезинфекция хлоргексидином приводила к полной эрадикации *A.baumannii* с кожи без вредных воздействий. Трёхмерная модель является полезным инструментом для изучения колонизации кожи и оценки действия новых дезинфектантов и антимикробных стратегий.

* Department of Infectious Diseases, Leiden University Medical Centre, Leiden, Netherlands.

TN6167, ОСТРОВК АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ У АВСТРАЛИЙСКОГО КАРБАПЕНЕМОУСТОЙЧИВОГО ШТАММА *ACINETOBACTER BAUMANNII* GC2, ST92.

TN6167, AN ANTIBIOTIC RESISTANCE ISLAND IN AN AUSTRALIAN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* GC2, ST92 ISOLATE / S. J. NIGRO, R. M. HALL*// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2012; 67: 6: 1342–1346.

Определяли строение и локализацию blaOXA-23, гена устойчивости к карбапенемам, и структуру островка устойчивости в хромосомальном гене comM штамма *Acinetobacter baumannii* — представителя австралийского глобального клона 2 (GC2). Для соединения генов и определения организации островка устойчивости использовали ПЦР длинных фрагментов. Ампликоны ПЦР секвенировали и подвергали биоформативному анализу. Было также выполнено мультилокусное секвенс-типирование (MLST). GC2 штамм A91 относится к последовательностям типа ST92 (Oxford MLST схема). Он содержал 37 тпн геномный островок устойчивости, Tn6167, в comM ге-

не. На одном конце Tn6167 несёт Tn6022²¹, прерываемый новой инсерционной последовательностью, ISAba17. На другом конце находятся гены sul2 (устойчивость к сульфонидам), strA-strB (устойчивость к стрептомицину) и детерминанта устойчивости к тетрациклину tet(B) в конфигурации ISAba1-sul2-CR2 Δ -tetA(B)-tetR(B)-CR2-strB-strA с частью tni конца Tn6022 — подобного транспозона, предшествующего им, и orf4 концом, следующим за ними. Транспозон, несущий blaOXA-23, был обнаружен в 11 тпн регионе, локализованном между Tn6022 Δ 1 и другими генами устойчивости. 17,6 тпн Tn6166 из GC2 референс-штамма A320/RUH134 может быть произведён из Tn6167 в результате единичной делеции, примыкающей к Tn6022 Δ 1 и вызывающей утрату большого центрального сегмента. Транспозоны, обнаруженные в comM GC2 штаммов A91 и A320, существенно отличаются от островков типа AbaR3, ранее найденных в штаммах глобального клона 1 (GC1) как по составу генов резистентности, так и организации. Однако *A.baumannii* клоны GC1 и GC2 содержат приобретённые гены антибиотикоустойчивости, связанные с транспозонами, заключёнными в comM.

* School of Molecular Bioscience, The University of Sydney, NSW 2006, Australia.

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ АНТИМИКРОБНЫЙ АГЕНТ В ОТНОШЕНИИ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ.

POLYETHYLENE GLYCOL-STABILIZED SULPHUR NANOPARTICLES: AN EFFECTIVE ANTIMICROBIAL AGENT AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIA/ S. R. CHOUDHURY, S. ROY, A. GOSWAMI, S. BASU*// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2012; 67: 5: 1134–1137.

Проведено изучение антибиотической эффективности полученных химическим синтезом и обычным способом (custom-made, по специальному заказу?) наночастиц серы (НЧС), отличающихся размерами и модификацией поверхности, в отношении ряда грамотрицательных бактерий (ГОВ) с мультилекарственной устойчивостью (МЛУ), продуцирующих нью-дельийскую металло-бета-лактамазу 1 (NDM-1). Были определены чувствительность штаммов к антибиотикам и наличие карбапенемаз, бета-лактамаз, 16S р-РНК метилаз и интегрона 1. Была получена физико-химическая характеристика химически синтезированных и стабилизированных полиэтиленгликолем (ПЭГ) НЧС размером 10 нм и полученных обычным способом некапсулированных

НЧС размером 60 нм и оценена их антибиотическая активность в отношении МЛУ ГОБ методами разведения в агаре (МРА) и микроразведений в бульоне (МРБ). Цитотоксичность химически синтезированных НЧС оценивали на клетках гепатомы человека (HepG2) WST-1 методом. Все штаммы обладали МЛУ и наряду с NDM-1 содержали другие бета-лактамазы, карбапенемазы, 16S р-РНК метилазы и интегрон 1. Химически синтезированные и ПЭГ-обработанные НЧС, согласно МРБ, проявили бактерицидный эффект в отношении всех испытанных штаммов в концентрации 9,41 и 18,82 мг/л. По данным, полученным МРА, НЧС имели одинаковое значение МПК (18,82 мг/л) для всех испытанных штаммов. С другой стороны, полученные обычным способом, НЧС в тех же концентрациях не обладали антибиотической активностью. Методом WST-1 не было обнаружено существенной цитотоксичности ПЭГ-НЧС даже при высоких концентрациях (94,08 мг/л). Настоящее исследование является первой попыткой показать и понять природу антибактериальной эффективности наночастиц в отношении МЛУ ГОБ, содержащих NDM-1.

* Division of Bacteriology, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata-700010, India.

РАЗЛИЧИЯ В *IN VIVO* АКТИВНОСТИ АНИДУЛАФУНГИНА, КАСПОФУНГИНА И МИКАФУНГИНА В ОТНОШЕНИИ ШТАМОВ *CANDIDA GLABRATA* ПРИ НАЛИЧИИ И ОТСУТСТВИИ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ FKS.

DIFFERENTIAL *IN VIVO* ACTIVITIES OF ANIDULAFUNGIN, CASPOFUNGIN, AND MICAFUNGIN AGAINST *CANDIDA GLABRATA* ISOLATES WITH AND WITHOUT FKS RESISTANCE MUTATIONS / M. C. ARENDRUP*, D. S. PERLIN, R. H. JENSEN, S. J. HOWARD, J. GOODWIN, W. HOPE // ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY MAY 2012; 56: 5: 2435–2442.

Ранее было отмечено, что МПК микафунгина (МКФ) для некоторых штаммов *Candida glabrata*,

имеющих участки хромосом с повышенной мутабельностью, возрастает меньше по сравнению с МПК других эхинокандинов (ЭХК), что может свидетельствовать об иной зависимости эффективности микафунгина от этих мутаций. Три клинических штамма *C. glabrata*: без fks мутаций S3 и имеющие мутации R83 (Fks2p-S663F) и RR24 (Fks1p-S629P) и соответственно с низким, средним и высоким значениями МПК, были использованы для оценки эффективности трёх доз каждого ЭХК на модели иммунокомпетентных мышей. Концентрации антибиотиков в плазме и почках определяли методом ВЭЖХ. Площадь области под кривой «концентрация-время (AUC)» при 1/2 и приближенной к максимальной активности определяли с помощью фармакокинетической-фармакодинамической математической модели. МКФ был равно эффективен в отношении штаммов S3 и R83, а значения AUC ЭХК, индуцирующего 1/2 максимальной эффективности (E_{50} s), составили 194,2 и 53,99 мг × час/л соответственно. В случае каспофунгина максимальная эффективность (E_{max}) в отношении S3 была выше, чем в отношении R83, но значения E_{50} были сходными (187,1 и 203,5 мг о час/л соответственно). Анидулафунгин снижал нагрузку каждого штамма на ≥ 1 -log (значения AUC, 139 до 557 мг × час/л). Ни один из ЭХК не был эффективен против RR24, несмотря на низкую вирулентность (сниженный максимальный рост, пролонгированная lag фаза, более низкая нагрузка в почках). AUC, ассоциирующаяся с E_{50} s, была выше, чем при средней экспозиции у человека со всеми дозозависимыми комбинациями, исключая МКФ и штамм R83. Таким образом, различия между МПК МКФ связаны с различной антигрибковой активностью на животной модели. Полученные данные могут быть использованы в клинической практике, а исследования должны быть продолжены.

* Unit of Mycology and Parasitology, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark.

Подготовлено Бондаревой Н. С.

Научно-технологической фармацевтической компании «ПОЛИСАН» — 20 лет

Twenty-Year Anniversary of Scientific Technological Pharmaceutical Firm POLYSAN

Двадцать лет отмечает Российская научно-технологическая фармацевтическая компания «ПОЛИСАН», главный офис которой находится в историческом центре Санкт-Петербурга, на Лиговском проспекте, недалеко от Московского вокзала. Фармацевтический завод, первая очередь которого была открыта в 2005 г., лицензирован по требованиям GMP, вторая очередь завода, ориентированная на выпуск инфузионных оригинальных растворов общей мощностью 13 млн упаковок в год, открыта 21 июня 2012 г. в присутствии губернатора города Г. Полтавченко. В 2009 г. утверждена стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. Основная ее цель — переход на инновационную модель развития фармацевтической промышленности. Компания «ПОЛИСАН» яркий пример реализации указанной стратегии, компания активно использует приоритеты новой модели: приоритет инноваций, качества, эффективности и безопасности лекарственных средств, приоритет производства высокотехнологичных фармацевтических субстанций, приоритет развития экспортно-способных производств и новых разработок. Современные условия фармацевтического рынка требуют гибкости производства, широкого использования достижений науки и техники, быстрой перестройки на новые виды деятельности. В этих условиях, сейчас научно-технологическая фармацевтическая фирма «ПОЛИСАН» имеет все шансы на успех.



Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия» поздравляет руководство и тысячный коллектив компании с юбилеем, желает процветания, творческих и производственных успехов, здоровья и благополучия.

ЦИКЛОФЕРОН®

мы создаем
УНИКАЛЬНОЕ



www.polysan.ru



ЩИТ
И МЕЧ
ИММУННОЙ
ЗАЩИТЫ

- Первый российский низкомолекулярный индуктор интерферона
- Оригинальный механизм фармакологического действия
- Безопасность, надежность и доказанная эффективность
- Идеальная совместимость
- Производится в соответствии с международным стандартом качества GMP

Показания к применению:

Таблетки

(Reg№ 001049/02):
вирусные инфекции
(грипп, ОРЗ, гепатиты, герпес),
кишечные инфекции,
нейроинфекции

Инъекции

(Reg№ 001049/03):
вирусные инфекции,
заболевания передаваемые
половым путем, кишечные
инфекции, нейроинфекции

Линимент

(Reg№ 001049/01):
уретриты, баланопоститы,
вагиниты, стоматиты,
пародонтиты



Форма выпуска: раствор для инъекций
125 мг/мл в ампулах по 2 мл №5;
таблетки по 0,15 г, покрытые
кишечнорастворимой оболочкой;
линимент 5% тубы по 5 мл и 30 мл



Обоснованный выбор для лечения ОРВИ и гриппа



информация для специалистов

Per. № 007362/10
реклама

Эргоферон

Ваш личный антивирус

Новый препарат для лечения гриппа и ОРВИ
обеспечивает три основных эффекта:
противовирусный, противовоспалительный и
антигистаминный.



ООО «НПФ «Материа Медика Холдинг»
Тел./факс (495) 684-43 33
Россия, 127473, г. Москва
3-ий Самотечный пер., дом 9
www.materiamedica.ru
Лицензия № 99-04-000422 от 10.12.07