

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 59



3-4'2014

Научно-практический журнал



ARSPharmRussiaCRO&Regulatory

предоставляет полный цикл услуг
по выводу новых лекарственных средств
на российский фармрынок.

- **организация и проведение клинических исследований II—IV фазы**
- **организация и проведение исследований по биоэквивалентности**
- **подготовка, оценка и адаптация необходимой документации**
- **обеспечение и контроль качества исследований**
- **подготовка регистрационного досье**
- **сопровождение процесса регистрации лекарственных средств и субстанций**

Контакты

**1321/3 Тестовская ул., д. 10
Бизнес Центр «Северная Башня»
+7 495 792 58 01
info@pharmrussia.com**

ARS PharmRussia CRO & Regulatory

provides full service for the implementation
of new drugs on the Russian pharmaceutical market.

- **organizing and realization clinical trials of Phase II—IV**
- **organizing and realization BE studies**
- **preparation, evaluation and adaptation of basic research documentation**
- **quality assurance and control**
- **preparation of the registration dossier**
- **support of the process of finished forms and active substances registration**

Contacts

**1321/3 10, Testovskayastreet
«North Tower»
+7 495 792 58 01
info@pharmrussia.com**

www.pharmrussia.com

Учредители:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка по каталогу Роспечать:

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

Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:

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

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

Установочный тираж 5000 экз.

© ГНЦА 2014

Типография:

ООО «Новелла»

Дата выхода: 16.06.2014

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 59

3—4'2014

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.
Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

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. Клишко 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 С. В.
Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

к.м.н. Кузнецова С. М.
к.б.н. Бежавская 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

Даниленко А. Н., Бибилова М. В., Спиридонова И. А.
Определение параметров гидрофобности олигомицинов
Палий Г. К., Назарчук А. А., Кулаков А. И., Назарчук Г. Г.,
Палий Д. В., Береза Б. Н., Олейник Д. П.
Исследование кинетики антимикробного
препарата декаметоксина
Левин Г. Я., Соснина Л. Н.
Спектрофотометрический метод определения
концентрации аминогликозидов в плазме крови
Смирнова И. П., Шкинев В. М., Руднев А. В.,
Кузнецова О. М., Каримова Е. В., Орлова В. С.
Изучение действия противоопухолевого фермента
L-лизин- α -оксидазы из культуры *Trichoderma harzianum*
Rifai F-180 на окисление L-лизина
методом капиллярного электрофореза
Мальдов Д. Г., Бельков А. П., Ильичев А. В., Асташкин Е. И.,
Григорян С. С., Андронина В. Л., Галегов Г. А.
Вещества из пиролизированных тканей тушек
пресмыкающихся различным образом модулируют
иммунитет млекопитающих разного пола.

Обзоры

Алимбарова Л. М.
Применение циклоферона
при лечении герпесвирусной инфекции
Беседнова Н. Н., Запорожец Т. С., Кузнецова Т. А.,
Крыжановский С. П., Ковалев Н. Н., Звягинцева Т. Н.
Гепатопротекторные эффекты экстрактов
и полисахаридов морских водорослей
Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н.
Вторичные метаболиты микроорганизмов —
потенциальный резерв фармацевтических препаратов

Original Papers

- 3** Danilenko A. N., Bibikova M. V., Spiridonova I. A.
Determination of Oligomycins Hydrophobicity Parameters
- 7** Palyi G. K., Nazarchuk A. A., Kulakov A. I., Nazarchuk G. G.,
Palyi D. V., Bereza B. N., Oleinik D. P.
Kinetics of Decamethoxine,
an Antimicrobial Agent
- 10** Levin G. Ya., Sosnina L. N.
Spectrophotometric Method for Aminoglycoside
Concentration Measurement in Blood Plasma
- 12** Smirnova I. P., Shkinev V. M., Rudnev A. V.,
Kuznetsova O. M., Karimova E. V., Orlova V. S.
Antitumor Enzyme L-Lysine- α -Oxidase
from *Trichoderma harzianum* Rifai F-180
and Investigation of Its Action on L-Lysine Oxidation
by Capillar Electrophoresis
- 16** Maldov D. G., Belkov A. P., Ilyichev A. V., Astashkin E. I.,
Grigoryan S. S., Andronova V. L., Galegov G. A.
Substances from Pyrolised Tissues
of Reptile Carcasses Differently Modulate Immunity
of Mammals of Both Sexes

Reviews

- 22** Alimbarova L. M.
Cycloferon and Management
of Herpes Virus Infection
- 30** Besednova N. N., Zaporozhets T. S., Kuznetsova T. A.,
Kryzhanovskii S. P., Kovalev N. N., Zvyagintseva T. N.
Hepatoprotective Effects of Extracts
and Polysaccharides from Seaweed
- 38** Orlova T. I., Bulgakova V. G., Polin A. N.
Microbial Secondary Metabolites as Potential Reserve
of Pharmaceuticals

По страницам журналов 45 Abstracts

* 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.

Определение параметров гидрофобности олигомицинов

А. Н. ДАНИЛЕНКО¹, М. В. БИБИКОВА², И. А. СПИРИДОНОВА²

¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля РАН, Москва

² ООО «ВИОРИН», Москва

Determination of Oligomycins Hydrophobicity Parameters

A. N. DANILENKO, M. V. BIBIKOVA, I. A. SPIRIDONOVA

N. M. Emmanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow
VIORIN, Moscow

Методом ВЭЖХ определены параметры гидрофобности пяти олигомицинов: А, В, С, F и SC-II, установлено расположение олигомицинов по возрастанию параметра гидрофобности: олигомицин В < олигомицин SC-II < олигомицин А < олигомицин F < олигомицин С.

Ключевые слова: антибиотики, олигомицины А, В, С, F, SC-II, гидрофобность.

The parameters of hydrophobicity of five oligomycins, i. e. A, B, C, F and SC-II were determined by HPLC. The location of the ascending hydrophobicity parameter was set: oligomycin B < oligomycin SC-II < oligomycin A < oligomycin F < oligomycin C.

Key words: antibiotics, oligomycins A, B, C, F, SC-II, hydrophobicity.

Группа макролидных антибиотиков, механизм действия которых в первую очередь связан с подавлением активности F_0F_1 -АТФазы митохондрий, вызывают большой интерес в связи широким спектром их биологической активности: проявляют высокую антигрибную и антипаразитарную активность, являются высокоспецифичными иммуносупрессорами, проявляют противовирусную, противоопухолевую активности, при этом особый интерес определяется способностью олигомицинов ингибировать МЛУ опухолевых клеток [1, 2]. К этим антибиотикам, общим элементом структуры которых являются 26-членные макролидные агликоны, относятся олигомицины с известной химической структурой, а также близкие по структуре и механизму действия апоптолидин, оссамицин и др. [3]. Ведутся исследования по получению полусинтетических производных этих антибиотиков [4].

Рассматриваемые антибиотики продуцируются актиномицетами и, будучи гидрофобными соединениями, извлекаются органическим растворителями из мицелия продуцента после биосинтеза.

Гидрофобность молекул лекарственных препаратов играет важную роль в их адсорбции и прохождении через мембраны [5]. Для количест-

венной оценки гидрофобности молекул традиционным прямым методом является измерение распределения веществ в системе октанол—вода [6], однако он является весьма трудоёмким, поэтому в настоящее время для оценки гидрофобности веществ разработан метод ВЭЖХ в обращённых фазах [7].

В литературе отсутствуют данные по сравнительному исследованию гидрофобности олигомицинов. В данной работе оптимизированы условия разделения пяти олигомицинов (А, В, С, F и SC-II) и определены индексы их гидрофобности.

Материал и методы

Олигомицины А, В и С были выделены из мицелия культуры *Streptomyces griseolus* 182, олигомицин F получен из культуры *Streptomyces* sp. 31, а олигомицин SC-II — из культуры *Streptomyces* sp. 17. [8, 9].

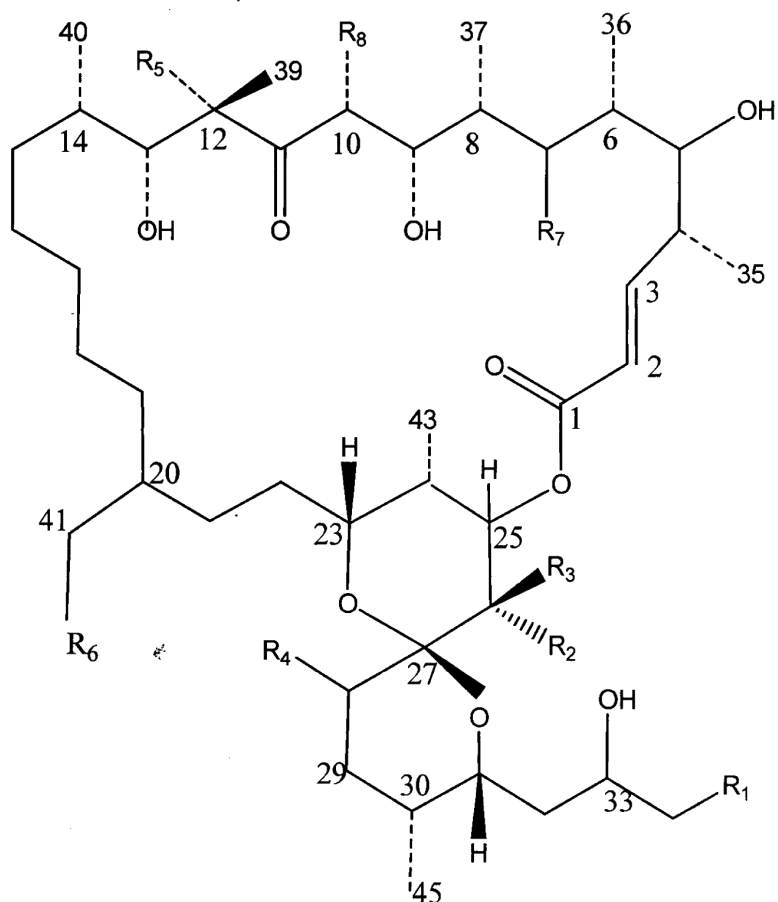
Антибиотики из мицелия экстрагировали ацетоном и реэкстрагировали этиловым эфиром, проводили очистку колоночной хроматографией, а окончательную очистку проводили методом ВЭЖХ на колонке Zorbax C18 (250×22 мм, 5 мкм); в качестве подвижной фазы использовали смесь метанол — вода в соотношении 85:15 (v/v) при скорости потока 8 мл/мин. Детектирование осуществляли рефрактометрическим детектором, объём вводимой пробы — 1 мл при концентрации 50 мг/мл.

Химическая структура антибиотиков была установлена на основании данных двумерного ЯМР.

Хроматографические исследования олигомицинов проводили на хроматографе Gilson в изократическом режиме на колонке Reprosil PUR C8 (150×4,6; 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали смесь метанол—вода в диапазоне объёмных соотношений: 74/26—86/14. На колонку наносили 25 мкл растворов индивидуальных олигомицинов или их смесей

© Коллектив авторов, 2014

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



Олигомицин	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
A	H	CH ₃	H	H	OH	CH ₃	O	CH ₃
B	H	CH ₃	H	OH	OH	CH ₃	O	CH ₃
C	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	O	CH ₃
F	CH ₃	H	H	H	OH	H	O	CH ₃
SC-II	H	CH ₃	H	H	OH	CH ₃	OH	H

Рис. 1. Структура олигомицинов А, В, С, А, SC-II.

с концентрациями 40 мкг/мл. Скорость протока подвижной фазы варьировали от 0,7 до 1,5 мл/мин. Основные эксперименты были проведены при оптимальной (наилучший фактор разделения олигомицинов) скорости протока подвижной фазы, равной 1 мл/мин. Детектирование пиков проводили УФ-детектором при длине волны 225 нм, соответствующей их максимальной экстинкции.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены химические формулы пяти исследованных олигомицинов, видно что они отличаются друг от друга только боковыми группами. На рис. 2 приведена хроматограмма смеси пяти идентифицированных олигомицинов. Идентификация хроматографических пиков была проведена с использованием внутренних стандартов следующим образом: в растворы пяти проб смесей олигомицинов объемами 1 мл (кон-

центрация каждого олигомицина 40 мкг/мл) было добавлено по 200 мкг каждого из олигомицинов и проведен хроматографический анализ каждой пробы. Хроматографический пик, площадь которого возрастала в несколько раз по сравнению с площадями других пиков, был отнесён к олигомицину, который добавлялся в пробу (хроматограммы не приводятся).

В табл. 1 приведены данные о временах (t_r) и факторах удерживания ($\log k$) для олигомицинов в зависимости от объёмной доли метанола (φ) в подвижной фазе. Фактор удерживания определяли по формуле:

$$k = (t_r - t_0) / t_0$$

где: t_r — времена удерживания олигомицинов; t_0 — время, соответствующее мёртвому объёму колонки и равное 2,16 мин.

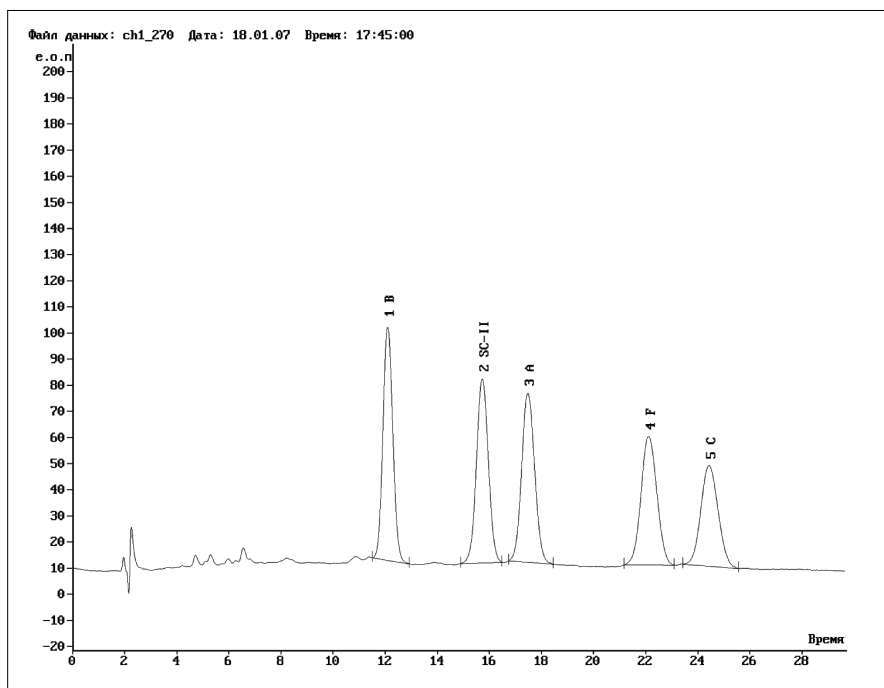


Рис. 2. Хроматограмма смеси олигомицинов — В; SC-II; А; F и С.

Условия хроматографирования: колонка Reprosil PUR C8 (150×4,6 мм; 5 мкм); подвижная фаза — 78% метанол с водой; скорость потока — 1 мл/мин; объем пробы, наносимой на колонку — 25 мкл ($c=40$ мкг/мл каждого олигомицина в смеси); детектирование УФ при 225 нм.

Использованы данные, приведённые в табл. 1, а также уравнение из [7]:

$$\log k = \log k_w - S \cdot \varphi,$$

где: $\log k_w$ — параметр гидрофобности, получаемый экстраполяцией $\log k$ от объемной доли метанола в подвижной фазе к нулевому значению.

Были определены параметры гидрофобности исследуемых олигомицинов (табл. 2).

Из данных табл. 2 следует, что олигомицины по возрастанию параметра гидрофобности могут быть рассмотрены следующим образом: олигомицин В < олигомицин SC-II < олигомицин А < олигомицин F < олигомицин С.

Заключение

В результате сравнительного анализа методом ВЭЖХ определены численные значения параметров гидрофобности 5 известных

Таблица 1. Зависимость факторов удерживания ($\log k$) олигомицинов от объемной доли метанола (φ) в подвижной фазе.

Объемная доля метанола (φ)	Наименование олигомицинов	Времена удерживания (t_r), мин	Фактор удерживания ($\log k$)
0,74	Олигомицин В	21,11	0,943
	Олигомицин SC-II	29,26	1,099
	Олигомицин А	34,05	1,169
	Олигомицин F	46,43	1,312
	Олигомицин С	52,12	1,364
0,76	Олигомицин В	16,25	0,814
	Олигомицин SC-II	22,28	0,969
	Олигомицин А	25,36	1,031
	Олигомицин F	34,12	1,170
	Олигомицин С	37,53	1,214
0,78	Олигомицин В	10,41	0,582
	Олигомицин SC-II	14,20	0,746
	Олигомицин А	16,04	0,808
	Олигомицин F	20,52	0,929
	Олигомицин С	23,14	1,045
0,80	Олигомицин В	8,57	0,472
	Олигомицин SC-II	11,40	0,631
	Олигомицин А	12,52	0,681
	Олигомицин F	16,01	0,807
	Олигомицин С	17,41	0,849
0,82	Олигомицин В	6,43	0,296
	Олигомицин SC-II	8,27	0,452
	Олигомицин А	9,07	0,505
	Олигомицин F	10,58	0,591
	Олигомицин С	11,58	0,640
0,86	Олигомицин В	4,23	-0,019
	Олигомицин SC-II	5,12	0,137
	Олигомицин А	5,27	0,157
	Олигомицин F	6,14	0,266
	Олигомицин С	6,45	0,298

Таблица 2. Параметры гидрофобности олигомицинов

Олигомицины	$\log k_w$	φ_0	Уравнения зависимости $\log k$ от объёмной доли метанола в подвижной фазе (φ)
Олигомицин-В	6,9248	86,7	$\log k = -8,0800\varphi + 6,9248$; $R^2 = 0,9956$
Олигомицин-SC-II	7,0870	87,6	$\log k = -8,0857\varphi + 7,0870$; $R^2 = 0,9965$
Олигомицин-А	7,4414	87,9	$\log k = -8,4657\varphi + 7,4414$; $R^2 = 0,9974$
Олигомицин-F	7,8572	88,9	$\log k = -8,8379\varphi + 7,8572$; $R^2 = 0,9960$
Олигомицин-С	8,0887	89,3	$\log k = -9,0593\varphi + 8,0887$; $R^2 = 0,9980$

Примечание. $\log k_w$ — параметр гидрофобности, полученный экстраполяцией $\log k$ от концентрации метанола в подвижной фазе к нулевому значению; φ_0 — индекс гидрофобности, соответствует процентному содержанию органической фазы в подвижной фазе, при котором время удерживания вещества превышает в два раза мертвое время ($\log k=0$).

олигомицинов. Это позволяет связать химическую структуру олигомицинов с уровнем их гидрофобности. Полученные данные важны для

прогнозирования уровня гидрофобности новых природных и полусинтетических олигомицинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бибилова М. В., Грамматикова Н. Э. и др. Механизм биологической активности макролидных антибиотиков-ингибиторов F0F1-АТФазы. Антибиотики и химиотер 2003; 12: 25—32.
2. Laatsch H., Kellner M., Gerhard Wolfá G. et al. Oligomycin F, a new immunosuppressive homolog of oligomycin A. J Antibiot 1993; 46: 9; 1334—1341.
3. Salomon A. R., Voehringer D. W., Herzenberg L. A., Khosla C. Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of F₀F₁-ATPase PNAS 2000; 97: 26: 14766—14771.
4. Лысенкова Л. Н., Королев А. М., Штиль А. А. и др. Цитотоксические полусинтетические производные макролидного антибиотика олигомицина А и способ их получения. Патент на изобретение №2454420, РФ, 2012.
5. Wender P. A., Janhowski O. D., Tabet E. A., Sato H. Toward a structure-activity relationship for apoptolidin: selective functionalization of the hydroxyl group array. Org Lett 2003; 5: 4: 487—490.
6. Fujita T., Iwasa J., Hansch C. A new substituent constant, π , derived from partition coefficients. J Am Chem Soc 1964; 86: 5175—5180.
7. Valko K., Siegel P. New chromatographic hydrophobicity index(φ_0) based on the slope and the intercept of the $\log K'$ versus organic phase concentration plot. J Chromatography 1993; 631: 49—61.
8. Кабанов А. Е., Даниленко А. Н., Спиридонова И. А. и др. Определение структуры основного компонента антибиотического комплекса, образуемого *Streptomyces griseolus* 182. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 10: 16—20.
9. Бибилова М. В., Грамматикова Н. Э., Спиридонова И. А. и др. Штамм *Streptomyces* sp. 17 — продуцент олигомицина SC-II (характеристика продуцента, биологические свойства антибиотика). Антибиотики и химиотер 2012; 57: 7—8: 3—6.

Исследование кинетики антимикробного препарата декаметоксина

Г. К. ПАЛИЙ, А. А. НАЗАРЧУК, А. И. КУЛАКОВ, Г. Г. НАЗАРЧУК, Д. В. ПАЛИЙ, Б. Н. БЕРЕЗА, Д. П. ОЛЕЙНИК

Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Винница, Украина

Kinetics of Decamethoxine, an Antimicrobial Agent

G. K. PALYI, A. A. NAZARCHUK, A. I. KULAKOV, G. G. NAZARCHUK, D. V. PALYI, B. N. BEREZA, D. P. OLEINIK

N. I. Pirogov Vinnitsa National Medical University, Vinnitsa, Ukraine

Приведены результаты исследования кинетики антимикробного препарата декаметоксина (ДКМ), находившегося в медицинских антимикробных текстильных материалах. Показано, что элюция ДКМ представляет сложный диффузионно-кинетический процесс, который зависит от его концентрации и экспозиции.

Ключевые слова: кинетика, антисептики, декаметоксин, полимерный состав, диффузия.

The kinetics of decamethoxine liberation from medical antimicrobial textiles was studied. The elution of decamethoxine was shown to be a complicated diffusive-kinetic process dependent on the exposure and concentration of decamethoxine.

Key words: kinetics, antiseptics, decamethoxine, polymeric composition, diffusion.

Введение

Антимикробная активность антибиотиков, антисептиков зависит от концентрации препаратов в тканях, биологических жидкостях. Она относится к параметрам, которые определяют эффективность антибиотикотерапии, антисептикотерапии. На основании данных о концентрации противомикробных средств разрабатывают стандартные схемы применения антимикробных препаратов [1].

Для оценки современных медицинских материалов недостаточно сорбционных, гигроскопических, эластических характеристик. Увеличение микробной нагрузки в больничной среде, повышение устойчивости возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний к противомикробным лекарственным препаратам требуют усиления комплекса мероприятий, направленных на повышение эффективности предупреждения, лечения заболеваний.

Для улучшения мероприятий по противомикробной профилактике и терапии инфекций приобретает важную роль разработка материалов медицинского назначения с пролонгированными антимикробными свойствами. В наше время широко используют физический способ введения лекарственных препаратов в текстильные материалы при помощи полимерных композиций. Создание

перевязочных материалов с пролонгированным антимикробным действием сопряжено с важной проблемой выбора полимеров, которые обеспечивают дозированное высвобождение препаратов.

Согласно требованиям, которые предъявляют к медицинским антимикробным материалам, полезными свойствами владеют натуральные полимеры-полисахариды. Известны композиции, которые содержат альгинат натрия-кальция, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, поливиниловый спирт, хитозан, коллаген, крахмал и др. Несмотря на широкое разнообразие существующих полимеров, ни один из них не обеспечивает достаточно эффективную и стабильную доставку антимикробного препарата [2–4]. Поэтому, изучение кинетики лекарственных антимикробных средств является актуальной проблемой для обоснования эффективности антимикробных медицинских материалов с пролонгированным действием.

Цель настоящей работы — исследование кинетики лекарственного антимикробного препарата декаметоксина.

Материал и методы

В данной работе приведены результаты исследования антимикробных текстильных материалов медицинского назначения, обработанных составом, который содержит антисептический лекарственный препарат декаметоксин (декаметилен-1, 10-бис-диметилкарбментоксиметил амония дихлорид [5, 6]), натриевую соль карбоксиметилкрахмала (КМК), оксиэтилцеллюлозу (ОЭЦ), поливинилацетатную дисперсию (ПВА), воду [7].

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 21018 Украина, Винница, ул. Пирогова, 56. Винницкого национального медицинского университета им. Н. И. Пирогова

Для исследования использовали текстильные материалы: марлю (ГОСТ 1172-93), вату (ТУ У 24.4-31301408-002-2001 (ГОСТ 5556-81), бязь (ТО 17 МД 13-26-96), обработанных двухванным способом. В первой ванне на протяжении двух минут обрабатывали текстильный материал полимерным составом (КМК, ОЭЦ, ПВА) с модулем ванны (МВ) 5, плюсовали до отжима 80%, затем погружали во вторую ванну с декаметоксином (ДКМ) на две минуты, МВ — 5, плюсовали до отжима 100%, сушили постепенно.

Для количественного определения ДКМ 0,5 мл водного раствора помещали в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 2 мл 0,1% раствора поливинилового спирта, 1 мл 0,07 раствора эозина, 1,5 мл 0,05 М раствора соляной кислоты, доводили объём раствора до метки и перемешивали (раствор А). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре (длина волны 540 нм; толщина кюветы 10 мм) в сравнении с раствором, приготовленным аналогично раствору А, за исключением ДКМ. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора рабочего стандартного образца (РСО). Содержание ДКМ (г/мл) рассчитывали по формуле [8]:

$$C_{\text{ДКМ}} = \frac{(D_1 \times 25 \times m_0 \times 1)}{(D_0 \times 500 \times 0,5 \times 25)} = \frac{(D_1 \times m_0)}{(D_0 \times 250)}, \quad (1)$$

где $C_{\text{ДКМ}}$ концентрация ДКМ в водной фазе, г/см³; D_1 — оптическая плотность рабочего раствора; D_0 — оптическая плотность рабочего стандартного образца ДКМ; m_0 — масса навески рабочего стандартного образца ДКМ, г.

Исследования кинетики ДКМ проводили на протяжении 360 часов (15 суток). Для получения достоверных экспериментальных результатов каждую экспериментальную точку повторяли трижды. Ошибка в исследованиях не превышала 5%. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel 2007 и «Statistica 8,0».

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены кинетические кривые высвобождения (выход) антимикробного лекарственного препарата ДКМ из бязи медицинского назначения, обработанной антимикробной полимерной композицией, в зависимости от времени нахождения образца в контакте с водной фазой. Аналогичные кривые получены в случае использования импрегнированных ваты и марли.

Наблюдали отсутствие кинетических границ, характерных для диффузионного высвобождения антисептика. На кинетических кривых, нелинейных от времени, отрезок в начале и линейное нарастание концентрации в конце указывали на сложный характер высвобождения ДКМ из текстильного материала (см. рис. 1). На основании полученных результатов установлено, что кинетика ДКМ начинается с процесса десорбции по типу диффузии (100 часов), высвобождения лекарственного препарата с постоянной скоростью нулевого порядка, которая не зависела от концентрации этого лекарственного препарата.

Кинетику высвобождения ДКМ в водную фазу можно описать диффузионно-кинетическим уравнением (для одностороннего направления) [9]:

$$\frac{\partial C_{\text{ДКМ}}}{\partial \tau} = D_{\text{ДКМ}} \frac{\partial^2 C_{\text{ДКМ}}}{\partial x^2} + k, \quad (2)$$

где $D_{\text{ДКМ}}$ — эффективный коэффициент диффузии декаметоксина, см²/с; k — константа гидролитической деструкции полимерной компози-

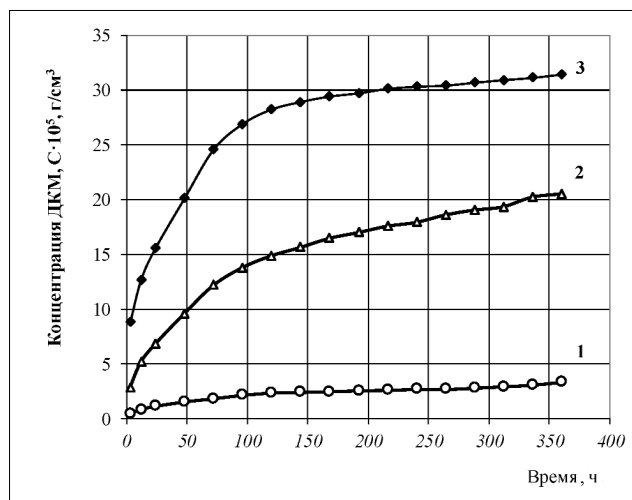


Рис. 1. Кинетические кривые высвобождения антисептика ДКМ из полимерного состава в водную фазу. 1 — концентрация ДКМ 0,1%; 2 — 0,5%; 3 — 1%.

ции, с⁻¹; x — направление диффузии, см; τ — время диффузии, с.

Исключив линейную часть $k \cdot \tau$ из значений ординат ($C_{\text{ДКМ}} - k \cdot \tau = m_\tau$) уравнения (2), кинетика ДКМ в водную фазу соответствует второму закону Фика, который характеризует изменение концентрации лекарства во времени и пространстве [9]:

$$\frac{\partial C_{\text{ДКМ}}}{\partial \tau} = D_{\text{ДКМ}} \frac{\partial^2 C_{\text{ДКМ}}}{\partial x^2} \quad (3)$$

Согласно уравнению, у поверхности распределение высвобождения вещества происходило за счёт диффузии по градиенту концентрации, скорость которой находилась в прямой зависимости от концентрации ДКМ в текстильном материале. Коэффициент диффузии в уравнении (3) является функцией молекулярных свойств вещества, которое диффундирует. Для определения диффузионной составляющей в кинетике выхода антисептика исключали линейную часть из общей концентрации, которая обусловлена гидролитической деструкцией полимерного состава в водной фазе.

Из данных графиков (рис. 2), характерных для диффузии ($m_t/m_\infty - \tau^{1/2}$), видно, что на начальном этапе (зона I) им был присущ линейный характер (диффузионная десорбция ДКМ в водную фазу).

В диапазоне концентраций ДКМ от 0,1 до 1% идентичный угол наклона диффузионных кривых свидетельствовал о независимости значения коэффициента диффузии от концентрации ДКМ. Зона (II) характеризует высвобождение ДКМ в результате гидролитической деструкции полимерной композиции в водной фазе (см. рис. 2).

Концентрации антисептика (m_∞) легко определяют из кинетических кривых. Концентрацию ДКМ, высвобождающегося в водную фазу, описывает уравнение:

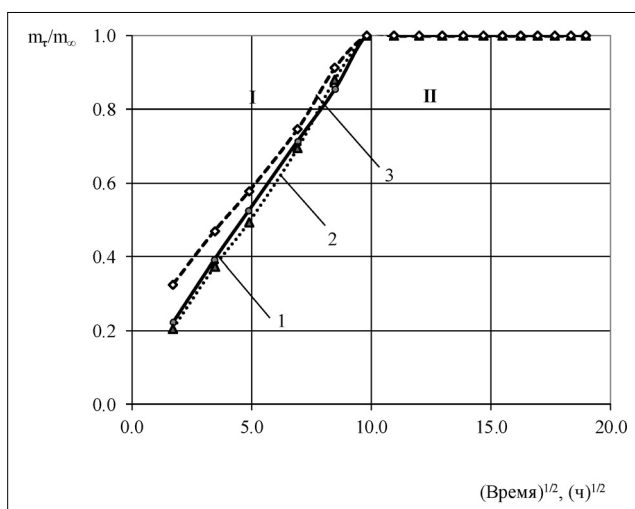


Рис. 2. Вклад диффузии в общую кинетику высвобождения ДКМ из полимерного состава в водную фазу.

1 — концентрация ДКМ 0,1%; 2 — 0,5%; 3 — 1%.

$$C_{\text{ДКМ}}(\tau) = m_\tau(\tau) + k\tau, \quad (4)$$

где $m_\tau(\tau)$ — количество высвободившегося антисептика ДКМ путём диффузии, г/см³; k — константа гидролитической деструкции полимерного состава, г/см³·год; τ — время контакта антисептического материала с водной фазой, год.

В уравнении (4) константа гидролитической деструкции определяет количество полимерного состава, подвергнувшегося деструкции в единице объёма за время экспозиции. По достижении пограничной концентрации ДКМ в водной фазе за счёт диффузии (m_∞) кинетику определяли по уравнению (4):

$$C_{\text{ДКМ}}(\tau) = m_\infty + k\tau, \quad (5)$$

где m_∞ — количество высвобождённого ДКМ в процессе диффузии.

Доказано, что количество ДКМ, высвободившегося путём диффузии в водную фазу, было прямо пропорциональным концентрации этого антисептика на текстильном материале (0,1–1%) и составляло 90% общего его значения. Таким образом, процесс высвобождения ДКМ из текстильного антимикробного материала, следует характеризовать эффективным коэффициентом диффузии (рис. 3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Навашин С. М., Фомина И. П. Рациональная антибиотикотерапия: справочник. М.: 1982; 496.
2. Олтаржевская Н. Д., Коровина М. А., Савилова Л. Б. Текстиль и медицина. Перевязочные материалы с пролонгированным действием. Росс хим журн 2002; XLVI: 1: 133–141.
3. Юданова Т. Н., Решетов И. В. Современные раневые покрытия: получение и свойства. Хим-фарм журн 2006; 40: 2: 24–31.
4. Ковальчук В. П. Экспериментальное исследование свойств антимикробных текстильных материалов. Вест Винницкого гос мед универ 1998; 1: 134–135.

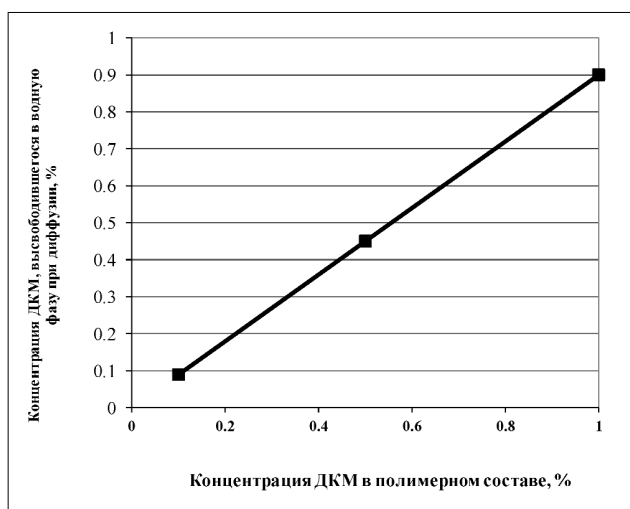


Рис. 3. Зависимость между концентрацией ДКМ на текстильном материале и его количеством, высвободившемся в водную фазу путём диффузии.

Параллельно диффузии наблюдали линейную кинетику выхода ДКМ. Скорость кинетики в пределах от 0,1 до 1% концентраций антимикробного лекарственного средства была постоянной. Результаты проведённого исследования позволили установить определённую закономерность кинетики ДКМ из полимерного состава, находившегося на медицинском текстильном материале. Полученные данные целесообразно использовать в медицинской практике.

Выводы

1. ДКМ высвобождается из медицинских текстильных материалов в течении 15 суток. Скорость высвобождения антисептика ДКМ является постоянной и находится в пределах 0,1–1% препарата.
2. Кинетика высвобождения ДКМ в водную фазу протекает по сложному диффузионно-кинетическому варианту. Диффузия ДКМ из медицинского текстиля, деструкция полимерного состава влияют на кинетику этого антисептика.

5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: 2007; 953.
6. Weuffen W., Berencsi G., Groschel D., Kemter B., Kramer A., Krasilnicov A. P. Handbuch der antiseptic verlag volk und gesund. Berlin. Band II. Teil 3. 1987; 552–566.
7. Патент №74853. Украина. Композиция для придания медицинским текстильным материалам антимикробных свойств с пролонгированным действием. Назарчук А.А., Палий В.Г., Кулаков А.И. [и др.]. Заявлено 10.05.2012; опубликовано 12.11. 2012. Бюл. 2012. № 21. — 4 с.
8. Декасан. Decasanum. ФС 42У-30/60-362-98. Киев. 1998. — 6 с.
9. Воробьев А. Ч. Диффузионные задачи в химической кинетике: учеб. пос. М.: 2003; 98.

Спектрофотометрический метод определения концентрации аминогликозидов в плазме крови

Г. Я. ЛЕВИН, Л. Н. СОСНИНА

Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии

Spectrophotometric Method for Aminoglycoside Concentration Measurement in Blood Plasma

G. YA. LEVIN, L. N. SOSNINA

Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nizhny Novgorod

Целью настоящего исследования являлась разработка простого, доступного и быстро выполняемого спектрофотометрического метода определения концентрации аминогликозидов в плазме крови, оценка его эффективности и чувствительности. Метод основан на способности аминогликозидов, в частности амикацина, изменять цвет красителя Fast Blue B Salt (Sigma-Aldrich). В плазму крови добавляли антибиотик разной концентрации, краситель, получившуюся смесь фильтровали для удаления нерастворимого осадка. Затем измеряли оптическую плотность полученного фильтрата относительно контрольной пробы, в которой отсутствовал антибиотик, при длине волны 450 нм на спектрофотометре. Показано, что повышение концентрации антибиотика в плазме приводит к прямо пропорциональному повышению экстинкции растворов антибиотика. Этот метод является простым, точным и отличается быстротой исполнения.

Ключевые слова: аминогликозиды, спектрофотометрические измерения, концентрация антибиотиков в плазме крови.

The aim of the research was to develop a simple, available and rapid spectrophotometric method for measuring aminoglycoside concentration in blood plasma and to evaluate the antibiotic efficacy and susceptibility. The method is based on the ability of aminoglycosides, in particular amikacin, to change the color of Fast Blue B Salt Dye (SIGMA-ALDRICH). An antibiotic at various concentrations and the dye were added to blood plasma. The resulting mixture was filtered to separate the insoluble residue. After that the optical density of the filtrate were measured spectrophotometrically against the control specimen with no antibiotic at the wavelength of 450 nm. It was demonstrated that an increase in the plasma antibiotic concentration led to a directly proportional increase of the antibiotic solution extinction. This is a simple, precise and rapid method.

Key words: aminoglycosides, spectrophotometric measurements, plasma antibiotic concentration.

Терапевтический эффект антибиотиков зависит от их концентрации в крови, которая обуславливает эффективность их бактерицидного и постантибиотического действия. Этим определяется тактика антибактериальной терапии и дозирования препаратов. Следует учитывать множество факторов, от которых зависит период полувыведения антибиотиков, — функцию печени, наличие хронической почечной недостаточности и её степени, объём циркулирующей крови и многое другое. Поэтому чрезвычайно важным является определение концентрации антибиотиков в плазме крови.

На протяжении последних десятилетий изучается возможность применения клеток крови как потенциальной системы доставки антибиотиков непосредственно к очагу поражения, так называемый направленный транспорт [1—4]. Одним из важных и наиболее сложных моментов в изучении

направленного транспорта антибиотиков является отсутствие простых методов определения скорости их высвобождения из клеток-контейнеров в плазму крови или в очаг поражения. Для этого необходимо изучение фармакодинамики антибиотиков, то есть концентрации их в плазме крови через определённые промежутки времени после введения.

Известны различные методы определения концентрации аминогликозидов в плазме крови: микробиологические, спектрофотометрические, хроматографические.

Самыми распространёнными являются микробиологические методы, основанные на бактерицидном действии антибиотиков в отношении высокочувствительных микроорганизмов, помещённых в твёрдую питательную среду, и на визуальной регистрации аналитического сигнала [5].

Известный способ количественного определения антибиотиков с использованием метода жидкостной хроматографии требует дорогостоящего оборудования, применения стандартов антибиотиков, а также характеризуется длительностью [6].

© Г. Я. Левин, Л. Н. Соснина, 2014

Адрес для корреспонденции: 603155 г. Нижний Новгород, Верхне-Волжская набережная, 18/1. ФГБУ «ННИИТО» Минздрава России

Влияние концентрации амикацина в плазме на степень экстинкции окрашенного раствора

Концентрация амикацина, мг/мл	Экстинкция при 450 нм
1	0,15±0,03
2	0,38±0,02*
4	0,69±0,05*
7,5	1,16±0,14*
15	1,53±0,09*
20	1,88±0,18*

Примечание. * — $p < 0,05$, сравнение с каждой предыдущей пробой, критерий Вилкоксона.

Спектрофотометрический метод определения концентрации аминокликозидов основан на взаимодействии антибиотиков с красителем. Однако и он требует осуществления ряда дополнительных манипуляций, в частности пропускания смеси через сефадекс G-15, что значительно удлинит и удорожает процедуру определения концентрации антибиотика. Концентрацию антибиотика определяют по градуировочному графику или методом добавок [7]. Для этого способа характерна также низкая воспроизводимость результатов.

Цель настоящего исследования — разработка достаточно простого, точного и быстровыполнимого спектрофотометрического метода определения концентрации аминокликозидов в плазме крови, оценка его эффективности.

Материал и методы

Работа проведена на 20 образцах крови здоровых доноров. Использован антибиотик амикацин (ОАО «Синтез», Россия) группы аминокликозидов. Метод определения концентрации амикацина в плазме крови осуществляли следующим образом.

Плазму получали путём центрифугирования стабилизированной цитратом натрия крови в течение 20 мин при 3000 об/мин. Навеску 500 мг антибиотика амикацина разводили в 5 мл дистиллированной воды. Затем готовили 6 проб плазмы с антибиотиком. Для этого в 1 мл плазмы добавляли 0,01, 0,02, 0,04, 0,075, 0,15 и 0,2 мл раствора антибиотика (разницу полученных объёмов восполняли 0,9% раствором NaCl), получая таким образом концентрации антибиотика в плазме 1, 2, 4, 7,5, 15, 20 мг/мл соответственно. Параллельно готовили контроль, в котором вместо антибиотика использовали 0,9% раствор NaCl. После добавления в каждую пробу и контроль по 1 мл 7,3% раствора красителя Fast Blue B Salt все пробы инкубировали 15 мин при комнатной температуре для стабилизации цвета. Затем разбавляли полученную смесь дистиллированной водой в соотношении 1:1. Для удаления образующегося нерастворимого осадка смесь фильтровали через фильтровальную бумагу (Apexlab, Россия). Фильтрат разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:5. Затем измеряли оптическую плотность полученного фильтрата против

контрольной пробы при длине волны 450 нм на спектрофотометре Spekol UV VIS (Zeiss, Германия).

Полученные данные обрабатывали с помощью метода непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Уровень статистической значимости принят равным $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведённых исследований было установлено, что раствор красителя Fast Blue B Salt изменяет цвет смеси плазмы с антибиотиком и образует нерастворимый осадок. При этом интенсивность окрашивания зависит от концентрации антибиотика, находящегося в плазме — чем выше концентрация, тем сильнее окрашивание. Фильтрация полностью удаляла осадок, а полученный фильтрат коричневого цвета был полностью прозрачен и пригоден для спектрофотометрической оценки интенсивности цвета. Были проведены спектрофотометрические измерения, в результате которых обнаружено, что повышение концентрации антибиотика в плазме крови приводило к прямо пропорциональному повышению экстинкции раствора (таблица).

Выводы

1. Раствор красителя Fast Blue B Salt изменяет цвет раствора антибиотика амикацина в плазме крови.
2. Повышение концентрации антибиотика амикацина в плазме приводило к прямо пропорциональному повышению экстинкции растворов при 450 нм.
3. Предложенный спектрофотометрический метод определения концентрации аминокликозидов в плазме крови является простым, точным и отличается быстротой исполнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпушина И.А., Стеблева Т.Ф., Бонитенко Е.Ю. Применение методики направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике (обзор литературы). Росс биомед журн 2004; 5: 12: 404—408.
2. Сарбаи В.И., Тихонова А.Г., Вуймо Т.А., Дербов А.Л., Александрович Ю.Г., Бутылин А.А., Витвицкий В.М., Аппауллаханов Ф.И. Эритроциты — носители лекарственных препаратов. Росс хим ж 2007; LI: 1: 143—149.
3. Pierige F., Serafini S., Rossi L., Magnani M. Cell-based drug delivery. Advan Drug Del Rev 2008; 60: 2: 286—295.
4. Hamidi M., Zarei N., Zarrin A.H., Mohammidi-Samani S. Preparation and *in vitro* characterization of carrier erythrocytes for vaccine delivery. Intern J Pharm 2007; 338: 1—2: 70—78.
5. Карпов В.Л. Определение аминокликозидных антибиотиков в биологических средах. Антибиотики 1984; 9: 695—703.
6. Рубашева Л.М., Лаврова М.Ф., Бражникова М.Г. Количественное определение антибиотика тобрамицина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Антибиотики 1983; 4: 254—258.
7. Сипливая Л.Е., Шевцова Е.М., Лазарев А.И., Прокопенко Л.Г. Иммуномодулирующее действие аминокликозидных антибиотиков при различных технологиях введения. Антибиотики и химиотер 1999; 44: 2: 29—32.

Изучение действия противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы из культуры *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 на окисление L-лизина методом капиллярного электрофореза

И. П. СМЕРНОВА¹, В. М. ШКИНЕВ², А. В. РУДНЕВ³, О. М. КУЗНЕЦОВА¹, Е. В. КАРИМОВА¹, В. С. ОРЛОВА¹

¹ Российский университет дружбы народов, Москва

² ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского, Москва

³ Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского, Москва

Antitumor Enzyme L-Lysine- α -Oxidase from *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 and Investigation of Its Action on L-Lysine Oxidation by Capillary Electrophoresis

I. P. SMIRNOVA, V. M. SHKINEV, A. V. RUDNEV, O. M. KUZNETSOVA, E. V. KARIMOVA, V. S. ORLOVA

Russian University of Peoples' Friendship, Moscow

D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Moscow

V. I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Moscow

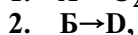
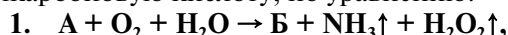
Проведено культивирование продуцента противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы (штамм *Trichoderma harzianum* Rifai F-180), выделение и очистка фермента в промышленных условиях. Впервые разработаны условия и исследовано действие L-лизин- α -оксидазы на окисление L-лизина методом капиллярного электрофореза. Дано описание реакции окислительного дезаминирования L-лизина и идентифицированы положения пиков компонентов реакций на электрофореграммах (ЭФГ). Определена средняя скорость каталитической реакции окисления L-лизина, равная 0,46 ОЕ/мин ($7,7 \times 10^{-3}$ ОЕ/с). Рекомендуется применение противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы как лекарственного препарата для лечения поверхностных опухолей и тканей с относительно высоким содержанием кислорода.

Ключевые слова: противоопухолевый фермент, L-лизин- α -оксидаза, триходерма, капиллярный электрофорез.

Trichoderma harzianum Rifai F-180, an organism producing the antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase was cultivated and the enzyme was isolated and purified under the manufacturing conditions. The effect of L-lysine- α -oxidase on oxidation of L-lysine was investigated for the first time by capillary electrophoresis and the procedure conditions were developed. The reaction of L-lysine oxidative deamination is described and location of the reaction components picks on the electrophoregrams was identified. The average rate of the catalytic reaction of L-lysine oxidation equal to 0.46 RU/min (7.7×10^{-3} RU/sec) was determined. The use of the antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase is recommended as a drug for the treatment of superficial tumors and tissue relative oxygen excess.

Key words: antitumor enzyme, L-lysine- α -oxidase, trichoderma, capillary electrophoresis.

Противоопухолевый фермент L-лизин- α -оксидаза (ЕС 1.4.3.14) катализирует реакцию окислительного дезаминирования L-лизина с образованием α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты, которая спонтанно циклизуется в Δ' -пирролидонкарбоновую кислоту, по уравнению:



где A — L-лизин; B — α -кето- ϵ -аминокапроновая, D — Δ' -пиперидин-2-карбоновая кислота [1, 2].

Образующаяся Δ' -пирролидонкарбоновая кислота не может (в силу пространственного расположения функциональных групп) выполнять

функции акцептора аминокислоты в реакциях трансаминирования аминокислот.

На кафедре биохимии медицинского факультета Университета дружбы народов был проведен поиск и отбор среди коллекции грибных культур продуцента противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы, выбран отечественный штамм *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 и проведен комплекс научных исследований, касающихся физико-химических и биологических свойств данного фермента [3–16].

Целью настоящего исследования было продолжение работ, начатых ранее. Нами впервые проведено исследование окислительного дезаминирования L-лизина противоопухолевым ферментом L-лизин- α -оксидазой гриба *Trichoderma harzianum* Rifai методом капиллярного электрофореза.

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6. РУДН

Материал и методы

В работе использовали штамм *Trichoderma harzianum* Rifai, продуцент противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы, депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером F-180. Штамм триходермы, культивировали на среде по ранее разработанной методике на оборудовании опытной технологической установки ИБФМ РАН им. Г. К. Скрыбина (г. Пушкино).

По окончании ферментации культуральную жидкость направляли на участок предварительной очистки, где мицелий гриба отделяли фильтрованием под вакуумом на нутч-фильтре. Вес полученной биомассы составил 3,5 кг. Полученный нативный раствор подвергали дополнительному сепарированию на сепараторе типа ОСБ при 9000 об/мин в течение 1 ч при температуре 2–4°C. Затем нативный раствор в объеме 55 л, полученный после отделения биомассы, концентрировали до 1,5 л. На последующем этапе проводили очистку L-лизин- α -оксидазы с использованием сорбентов DEAE-сефацела, сефадексов G-100 и G-200 [7].

Активность L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости *Trichoderma* рассчитывали по приросту H_2O_2 , количество которой определяли спектрофотометрическим ортоданизидиновым микрометодом [6].

Для оценки чистоты препарата использовали электрофорез в 10% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия, а также капиллярный электрофорез [16]. Исследования проводили на приборе для капиллярного электрофореза «Капель 105» («Люмэкс», Санкт-Петербург, Россия), снабжённом спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны (190–380 нм). В работе использовали кварцевый капилляр с внешним полиимидным защитным покрытием. Размеры капилляра: внутренний диаметр 75 мкм; общая длина капилляра 37,5 см, расстояние до детектора 28 см. Эксперименты проводили при 25°C и длине волны 220 нм с использованием источника высокого напряжения положительной полярности. Маркёр электроосмотического потока (ЭОП) — диметилсульфоксид (ДМСО). Для восстановления активной поверхности капилляра между измерениями его промывали в течение 1 мин тридистиллированной водой, 0,01 М раствором NaOH и разделительным буферным раствором.

Результаты и обсуждение

Известно, что противоопухолевой фермент L-лизин- α -оксидаза катализирует окислительное дезаминирование L-лизина с образованием α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты и перекиси водорода.

Исследование избирательности действия показало, что L-лизин- α -оксидаза действует практически только на L-лизин и лишь в небольшой степени (менее 6% от активности по отношению к L-лизину) на две другие аминокислоты, которые могут рассматриваться как структурные аналоги L-лизина: L-орнитин и L-аргинин [8, 15].

L-лизин- α -оксидаза представляет собой гликопептид с молекулярной массой 120 кДа, состоящий из двух идентичных субъединиц.

Для изучения реакции окислительного дезаминирования L-лизина на первой стадии были идентифицированы положения пиков L-лизина (рис. 1), L-лизин- α -оксидазы (рис. 2), смеси L-лизина с L-лизин- α -оксидазой и Δ' -пирролидонкарбоновой кислоты. Положение пика в спектре Δ' -пирролидонкарбоновой кислоты соответству-

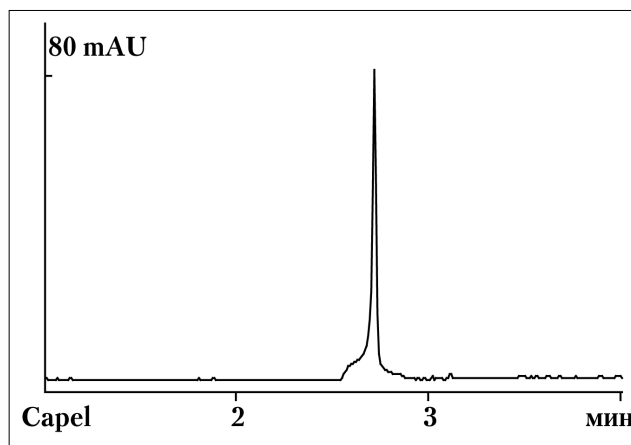


Рис. 1. Электрофореграмма L-лизина.

Ввод пробы L-лизин 20/10 (мБар/сек), ДМСО 5/10. Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 63 мкА. Буфер фосфатный pH 7,4 — 20 мМ. Пик на ЭФГ: 2.71 мин (ДМСО+ L-лизин); L-лизин на ЭФГ выходит вместе с маркёром ЭОП — ДМСО.

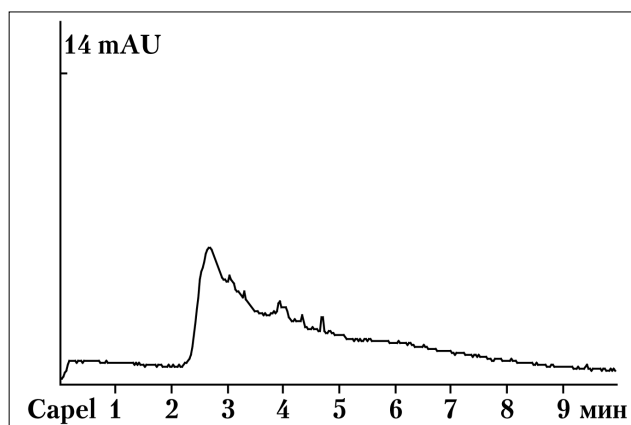


Рис. 2. Электрофореграмма L-лизин- α -оксидазы.

Ввод пробы 30/10 (мБар/сек). Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 64 мкА. Буфер фосфатный pH 7,4 — 20 мМ.

ет положению других аминокислот и не может быть идентифицировано в смеси с L-лизинном. Поэтому можно было предположить, что пик с $t=6,0$ мин соответствует пику фермент-субстратного комплекса (рис. 3).

Электрофореграмма противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы характеризуется широкой полосой, типичной для оксидаз, и объясняется полидисперстностью продукта и наличием нескольких различных функциональных групп.

Нами впервые изучены электрофореграммы смесей L-лизин- α -оксидазы и L-лизина при pH 7,4 и исследована ферментативная реакция (рис. 3–5).

Электрофоретическая подвижность фермент-субстратного комплекса продукта реакции $\mu = -27,2 \pm 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$. На полученных ЭФГ на-

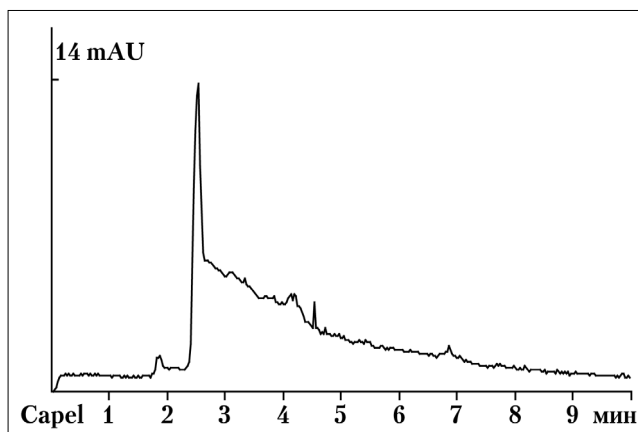


Рис. 3. Электрофореграмма исходной смеси L-лизина (0.002 М) и L-лизин- α -оксидазы.

Ввод пробы 30/10 (мБар/сек) Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 64 мкА. Буфер фосфатный pH 7,4 – 20 мМ. Пики на ЭФГ: 2,5 мин (ДМСО + L-лизин).

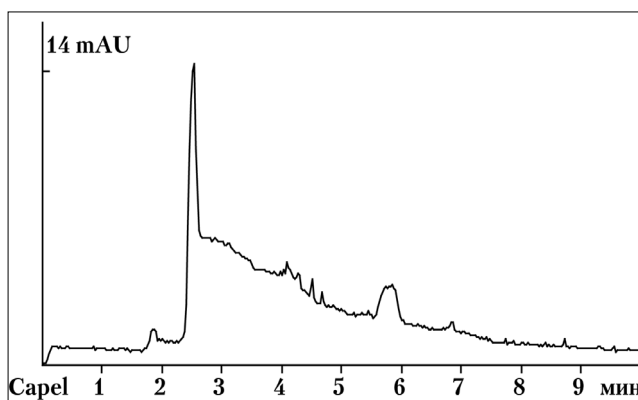


Рис. 4. Электрофореграмма смеси L-лизина (0,002 М) и L-лизин- α -оксидазы через 54 мин после начала реакции.

Ввод пробы 30/10 (мБар/сек) Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 64 мкА. Буфер фосфатный pH 7,4 – 20 мМ. Пики на ЭФГ: 2,5 мин (ДМСО+L-лизин), 6,0 мин (фермент-субстратный комплекс).

блюдается только увеличение площади пика фермент-субстратного комплекса (рис. 6.) Площади пиков L-лизина и L-лизин- α -оксидазы практически не меняются. Из приведённых ЭФГ видно, что пик с $t=6,0$ мин можно отнести к фермент-субстратному комплексу реакции.

В таблице представлена зависимость скорости окисления L-лизина в присутствии L-лизин- α -оксидазы. Как видно площадь пика S зависит от времени прохождения ферментативной реакции.

Высокая специфичность противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы объясняется строгим геометрическим и электронным соответствием структуры субстрата структуре активного центра фермента, на котором субстрат сорбируется и далее претерпевает химические

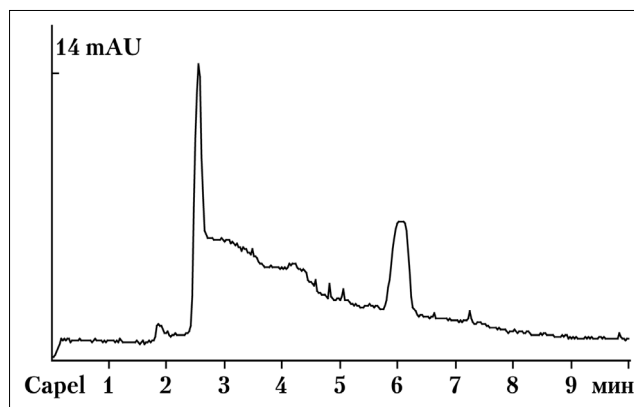


Рис. 5. Электрофореграмма смеси L-лизина (0.002 М) и L-лизин- α -оксидазы через 145 мин после начала реакции.

Ввод пробы 30/10 (мБар/сек). Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 64 мкА. Буфер фосфатный pH 7,4 – 20 мМ. Пики на ЭФГ: 2,5 мин (ДМСО+L-лизин), 6,0 мин (продукт реакции).

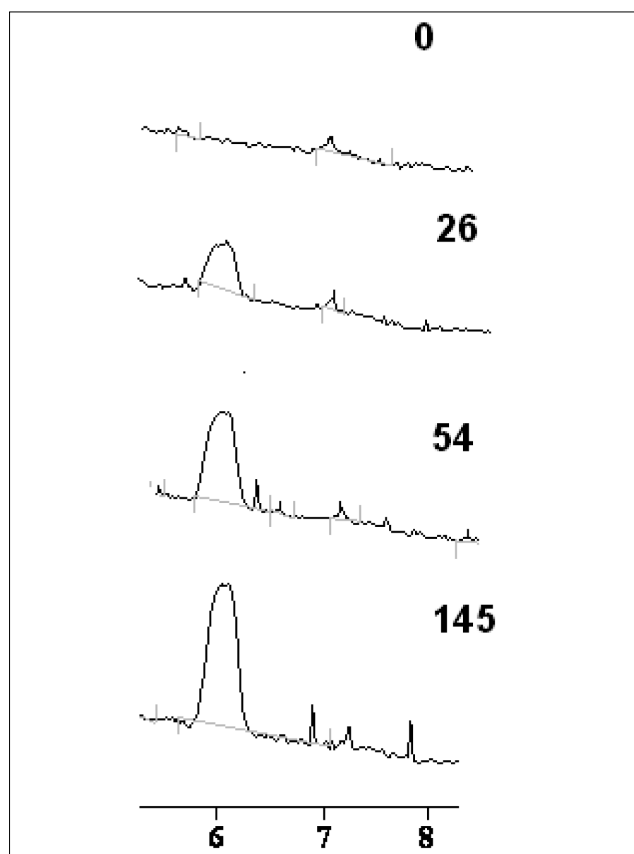


Рис. 6. Изменение пика продукта ферментативной реакции в зависимости от времени (мин).

превращения. Известно [17], что для объяснения эффективности ферментативного катализа химическая реакция разбивается на ряд энергетически более лёгких промежуточных реакций, в которых участвует фермент. Образование первичного фермент-субстратного комплекса даёт

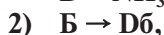
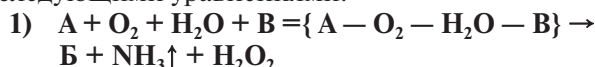
Скорость реакции окисления L-лизина (0.002 М) в присутствии противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы**

Номер фореграммы	Время реакции, мин	Площадь пика, ОЕ*	Скорость, ОЕ/мин
1	0	0	0
2	26	14,5	0,56
3	54	30,0	0,56
4	85	42,5	0,39
5	105	51	0,42
6	145	67,8	0,36

Примечание. * — ОЕ — относительные единицы; ** — реакция исследовалась в фосфатном буфере, pH 7,4, 20 мМ.

выигрыш энергии, достаточный для ускорения процесса в целом.

Таким образом, данная ферментативная реакция при участии L-лизин- α -оксидазы описывается следующими уравнениями:



где $\{A - O_2 - H_2O - B\}$ — фермент-субстратный комплекс; B — α -кето- ϵ -аминокапроновая кислота; D — $\leftarrow \Delta'$ -пиперидин-2-карбоновая кислота [1].

Скорость ферментативной реакции (V) зависит от концентрации L-лизин- α -оксидазы (B) и L-лизина (A) и описывается уравнением Михаэлиса — Ментен.

В данном случае концентрации фермента, кислорода, воды практически постоянны и изменяется (уменьшается) только концентрация субстрата (L-лизина) за счёт его окисления. То есть, скорость реакции прямо пропорциональна концентрации фермента (B) и равна

$$V = K_m [B][A] / K_{m1} + [A],$$

где: K_m и K_{m1} — соответствующие константы реакции.

Заключение

Таким образом, для изучения действия противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы из культуры *Trichoderma harzianum* Rifai на окисление L-лизина может использоваться капиллярный электрофорез.

Можно предположить возможность использования капиллярного электрофореза в поиске и исследовании действия оксидаз других L-аминокислот-продуцентов противоопухолевых ферментов, как метода определения их ферментативной активности.

Из полученных результатов следует также добавить, что наиболее эффективным, как нам представляется, является применение противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы как лекарственного препарата для лечения поверхностных опухолей и тканей с относительно высоким содержанием кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

- Kusakabe H., Kodama K., Kununaka A., Yoshino H., Soda K., Misono H. A new antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride*. J Bio Chem 1980; 255: 3: 976—981.
- Kusakabe H., Kodama K., Machida H., Midorikawa J., Kuninaka A., Misono H., Yoshino H. and Soda K. Occurrence of a novel enzyme, L-lysine- α -oxidase with antitumor activity in cultural extract of *Trichoderma viride*. Agr Biol Chem 1979; 43: 2: 976—981.
- Алексеев С.Б., Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Новый иммуномодулятор из триходермы. Вопр мед хим 1997; 43: 2: 112—115.
- Смирнова И.П., Селищева А.А., Алексеев С.Б., Подборонов В.М. Эффективность антигерпетического действия различных лекарственных форм L-лизин- α -оксидазы. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 1: 9—12.
- Алексеев С.Б., Селищева А.А., Смирнова И.П., Подборонов В.М., Иванова А.А. Перспективы терапии онкологических заболеваний L-лизин- α -оксидазой триходермы. Международ журн иммунореабилит 2010; 12: 2: 164—165.
- Смирнова И.П., Сяткин С.П., Берёзов Т.Т. Спектрофотометрический метод определения L-лизин- α -оксидазы. Вопр мед хим 1984; 1: 133—136.
- Смирнова И.П., Шкинев В.М., Руднев А.В., Шнейдер Ю.А., Кузовников А.Е. Технологии выделения и очистки L-лизин- α -оксидазы. Биотехнология 2010; 6: 52—60.
- Лаугалене Н.Ф., Веса В.С., Янкевичене Р.Н., Пуоджюте С.П., Суджювене О.Ф., Песлякас И.И., Хадуев С.Х., Берёзов Т.Т. Новый метод очистки L-лизин- α -оксидазы гриба *Trichoderma*. Вопр мед хим 1990; 4: 88—90.
- Смирнова И.П., Алексеев С.Б. Влияние L-лизин- α -оксидазы на развитие герпетической генитальной инфекции у морских свинок. Бюлл экспер биол мед 1999; 128: 12: 654—656.
- Смирнова И.П., Алексеев С.Б. Биосинтез противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma* sp. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 5—6: 8—11.
- Смирнова И.П., Шкинев В.М., Руднев А.В., Шнейдер Ю.А., Кузовников А.Е. Технологии выделения и очистки L-лизин- α -оксидазы. Биотехнология 2010; 6: 52—60.
- Подборонов В.М., Кузовников А.Е., Зайцева А.К., Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Исследование противоопухолевой субстанции из триходермы. Антибиотики и химиотер 2011; 56: 9—10: 3—6.
- Подборонов В.М., Кузовников А.Е., Зайцева А.К., Смирнова И.П. Доклинические испытания противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы. Антибиотики и химиотер 2010; 55: 9—10: 33—36.
- Шнейдер Ю.А., Хомик А.А., Кишмахова Л.М., Смирнова И.П. Культивирование сапрофитного гриба триходермы и биосинтез L-лизин- α -оксидазы. Вестник РУДН сер агрономия 2010; 4: 49—55.
- Янкевич Н.Б., Лаугалене Н.Ф., Веса В.С., Хадуев С.Х., Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Усовершенствованная схема очистки L-лизин- α -оксидазы гриба *Trichoderma* sp. // Вопр мед хим 1989; 2: 84—86.
- Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Биотехнология фермента L-лизин- α -оксидазы из триходермы. Пенза, 2014; 189.
- Энгельгарт Х. Руководство по капиллярному электрофорезу. М.: 1996; 112.

Вещества из пиролизированных тканей тушек пресмыкающихся различным образом модулируют иммунитет млекопитающих разного пола

Д. Г. МАЛЬДОВ¹, А. П. БЕЛЬКОВ¹, А. В. ИЛЫЧЕВ¹, Е. И. АСТАШКИН²,
С. С. ГРИГОРЯН³, В. Л. АНДРОНОВА⁴, Г. А. ГАЛЕГОВ⁴

¹ ЗАО «Скай ЛТД»

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

³ Институт микробиологии, эпидемиологии и иммунологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

⁴ Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского, Москва

Substances from Pyrolysed Tissues of Reptile Carcasses Differently Modulate Immunity of Mammals of Both Sexes

D. G. MALDOV, A. P. BELKOV, A. V. ILYICHEV, E. I. ASTASHKIN, S. S. GRIGORYAN, V. L. ANDRONOVA, G. A. GALEGOV

Sky Co., Ltd., Moscow

I. M. Sechenov 1st Moscow State Medical University, Moscow

N. F. Gamaleya Institute of Microbiology, Epidemiology and Immunology, Moscow

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Moscow

В водорастворимом пиролизированном материале из тушек пресмыкающихся были обнаружены вещества, обладающие гендерным действием на иммунную систему. Гендерные различия были показаны на выделенных нейтрофилах крови, цельной крови и *in vivo* по противовирусной активности на экспериментальных животных, инфицированных тремя видами вирусов: вирусом простого герпеса типа 1, вирусом энцефаломиокардита и вирусом гепатита мышей. Вероятный механизм действия, ингибирующий иммунную защиту самцов, связан с протеинкиназным каскадом, включающим протеинкиназу C, активируемым фоболмирикатом в клетках иммунной системы.

Ключевые слова: иммунная система, гендерное различие, экспериментальные животные, вирусы.

Substances with gender action on immunity were detected in water soluble hydrolysed matter from reptile carcasses. The gender action was shown on isolated blood neutrophils, whole blood and *in vivo* by the antiviral activity on experimental animals, contaminated with three types of viruses: *Herpes simplex* type 1, the virus of encephalomyocarditis and the virus of hepatitis of mice. The possible mechanism of the inhibitory action on the male immunity was associated with the protein kinase cascade, including protein kinase C, activated by phorbolmyristate in the cells of the immune system.

Key words: immune system, gender difference, experimental animals, viruses.

Введение

В системе регуляции иммунной системы у самок и самцов, по крайней мере, у млекопитающих имеются существенные отличия. Большая часть показанных в настоящее время отличий связана с влиянием на иммунную систему половых гормонов [1, 2]. В частности, у человека иммунная система женщин более реактивна, чем мужчин, поэтому первые лучше защищены от инфекций, но чаще страдают от аутоиммунных заболеваний [3]. Отличия наблюдаются не только в разной концентрации половых гормонов, но и различной концентрации клеток иммунной системы в крови, так как в крови женщин больше лимфоцитов [1]. Для целого ряда заболеваний было отмечено, что

их протекание проходит у мужчин и женщин различно именно из-за реакций иммунной системы [4, 5]. Таким образом, существование гендерных различий в иммунной системе млекопитающих мужского и женского пола очевидно. Однако веществ, по-разному взаимодействующих с клетками, отвечающими за иммунный ответ у людей и животных разного пола, не обнаружено. Задачей данной работы являлось исследовать ряд веществ, различно модулирующих реакции иммунитета в препаратах крови людей и экспериментальных животных разного пола.

Материал и методы

Препараты. Препарат 8.7 представляет собой экстракт из пиролизированных тканей пресмыкающихся, обработанный хлороформом для удаления гидрофобных примесей. Экстракт был разделен гель-фильтрацией на G-15 (рис. 1, а), а затем на DEAE Сефарозе (рис. 1, б). На отдельные вещества разделение производилось на колонке Silica (рис. 1, в).

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16. Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского

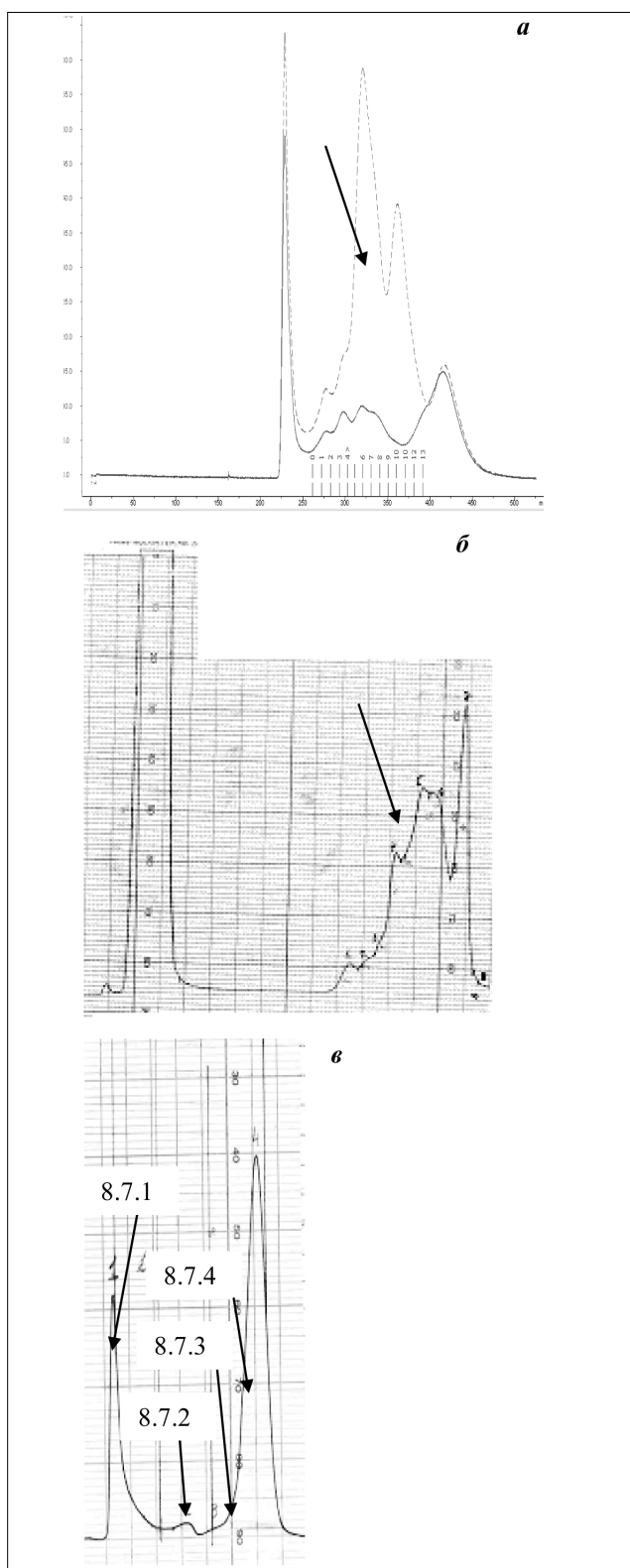


Рис. 1. Выделение фракции 8.7 и содержащихся в ней веществ.

а — Гель-фильтрация препарата из пресмыкающихся на G-15. Стрелкой выделен пик фракции 8. Пунктирной линией — обозначен профиль, регистрируемый при длине волны 254 нм, сплошной линией — 280 нм; **б** — Ионно-обменная хроматография на DEAE-Сефарозе. Стрелкой выделен пик фракции 8.7; **в** — Разделение фракции 8.7 на отдельные вещества на Silica.

Коммерческие реактивы и среды: форболовый эфир — 12-О-тетрадеканолфторбол-13-ацетат (Sigma), люцигенин (Sigma), среда Хенкса (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова).

Активность в пробах цельной крови и во фракции нейтрофилов. Метод регистрации биологической активности изучаемых фракций — хемилюминесценция образцов цельной крови в присутствии люминофора — люцигенина, как описано ранее [6]. Биологическая активность количественно выражается в условных единицах хемилюминесценции — у.е.

Выделение нейтрофилов. Гепаринизированную кровь мужчин и женщин получали из локтевой вены. Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования на двухступенчатом градиенте плотности Фиколл-Гипак (1,119 и 1,078 г/мл). Образование радикалов кислорода регистрировали на хемилюминометре «Биотокс» (Россия) в имп/сек.

В качестве растворителя для образцов препарата 8.7 использовалась среда Хенкса, в ней же проводилось тестирование активности нейтрофилов.

Вирусы. Вирус герпеса простого типа 1 (ВПГ-1) получен из Государственной коллекции музея вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. В смертельных опытах использовалась заражающая доза вируса, обеспечивающая при внутрибрюшинном (в/б) введении 60% гибель животных в контрольной нелеченой группе. Препарат 8.7 вводили в/б в разовой дозе 100 мкг/мышь в объеме 0,2 мл двукратно: первое введение через два часа после заражения, второе — через 72 ч после заражения.

Вирус гепатита мышей. В исследовании использован сухой, лиофилизированный вирус гепатита мышей (ВГМ), штамм Мещерина (семейство коронавирусов), полученный из Государственной коллекции музея вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН.

В/б заражение экспериментальных мышей проводили в дозе 100 LD₅₀ на мышь в объеме 200 мкл. В первый день препарат 8.7 вводили через 2 ч после заражения и второе введение — через 72 ч после заражения.

Вирус энцефаломиокардита мышей. В исследовании использован вирус энцефаломиокардита мышей (ЕМС), штамм «Колумбия SK-Col-SK», из Государственной коллекции музея вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН с инфекционной активностью в культуре фибробластов мышей L-929 10⁷ ТЦД₅₀.

В/б заражение экспериментальных мышей проводили в дозе 100 LD₅₀ на мышь в объеме 200 мкл. В первый день препарат 8.7 вводили через 2 ч после заражения и затем через 72 ч после заражения.

Животные. В работе использовано 240 белых беспородных (б/п) мышей массой 16—18 г, полученных из питомника «Столбовая» РАМН (самок и самцов). Из них по 60 особей обоего пола ($n=60$) было использовано для предварительного титрования инфекционной активности вирусов, остальные — для проведения экспериментальных исследований.

Для оценки противовирусной активности препарата *in vivo* для каждой из исследуемых групп вычисляли:

- % гибели животных;
- среднюю продолжительность жизни животных (СПЖ);
- % защиты препарата;
- коэффициент защиты препарата (КЗ).

По окончании срока наблюдения выживших мышей забивали, вскрывали и проводили визуальное исследование основных органов-мишеней ВГМ-инфекции — печени, желчного пузыря, кишечника.

Величину инфекционного титра ВПГ-1 в органном материале определяли с использованием метода бляшкообразования [7], как описано нами ранее [8].

Увеличение средней продолжительности жизни животных вычисляли по формуле:

$$УСПЖ = СПЖ_K - СПЖ_П,$$

где $СПЖ_K$ — средняя продолжительность жизни (СПЖ) в контрольной группе; $СПЖ_П$ — средняя продолжительность жизни в группе, где применяли исследуемый препарат.

Результаты исследований

НАДФН-оксидаза является одним из наиболее характерных ферментов иммунной системы, на активность которых влияют практически все иммуномодуляторы, действующие непосредственно на нейтрофилы и моноциты.

Вещества, выделенные из фракции 8.7, по-разному действовали на способность экскретировать супероксид радикал НАДФН-оксидазой цельной крови доноров разного пола. В пробах цельной крови доноров-женщин закономерность действия различных веществ в дозе 10 мкг/мл выражалась разным количеством экскретируемого супероксида $8.7.1 < 8.7.2 \leq 8.7.3$ при значительном различии его общего содержания у разных доноров. У доноров-мужчин закономерность индукции НАДФН-оксидазы была несколько иной: $8.7.1 < 8.7.2 > 8.7.3$ (рис. 2, а). При использовании в опыте суспензии выделенных нейтрофилов из крови женщин основное соотношение индуцированной активности для разных веществ из фракции 8.7 в концентрации 10 мкг/мл, было то же самое, что и для цельной крови — $8.7.1 < 8.7.2 \leq 8.7.3$ (рис. 2, б). У доноров-мужчин НАДФН-оксидаза выделенных нейтрофилов обладала едва различимой активностью в ответ на добавление в среду 10 мкг/мл 8.7.1, и вообще не реагировала на добавление 8.7.2, и только при введении 8.7.3 эффект был сравним с таковым у женщин, хотя и ниже в 2–2,7 раза (рис. 2, б).

Действие вещества 8.7.1 в препаратах цельной крови мужчин и женщин описывалось различными концентрационными кривыми.

В крови мужчин наблюдалось увеличение продукции активного кислорода при концентрации вещества 5 мкг и спад при 20 мкг 8.7.1; в препарате крови женщин в данном диапазоне концентраций действие препарата описывалось фактически прямой параллельной оси абсцисс (рис. 3). Кроме того, в крови доноров-мужчин ($n=6$) в присутствии любого из веществ фракции 8.7 (8.7.1, 8.7.2, 8.7.3 и 8.7.4) в концентрации 20 мкг/мл полностью блокировался эффект форболового эфира на НАДФН-оксидазу нейтрофилов. В пробах крови доноров-женщин ($n=8$) этого эффекта не наблюдалось.

Все остальные полученные вещества действовали по очень сходным с 8.7.1 концентрационным закономерностям, хотя и с различной индуцирующей способностью. Наиболее активны были фракции 8.7.2 и 8.7.3 (у отдельных доноров до 2200 условных единиц люминесценции), наименее активной была фракция 8.7.4. Смесь фракций превосходила по активности индукции все фракции (до 4500 условных единиц люминесценции).

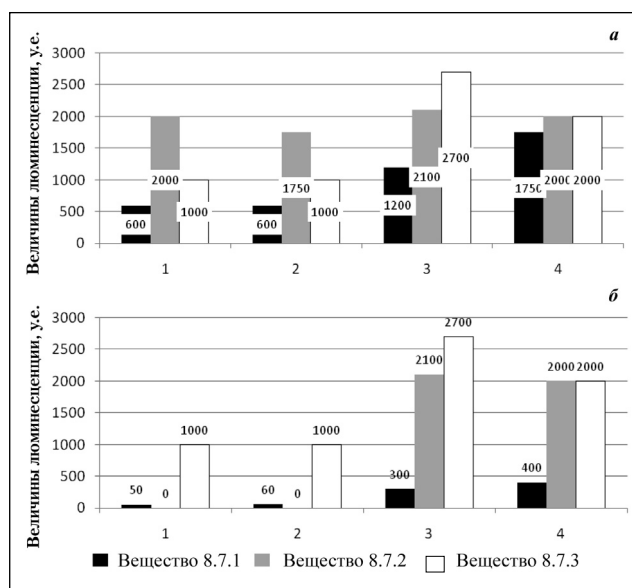


Рис. 2. Действие веществ из фракции 8.7 (по 10 мкг/мл) на пробы крови (а) и пробы нейтрофилов (б) мужчин (1, 2) и женщин (3, 4).

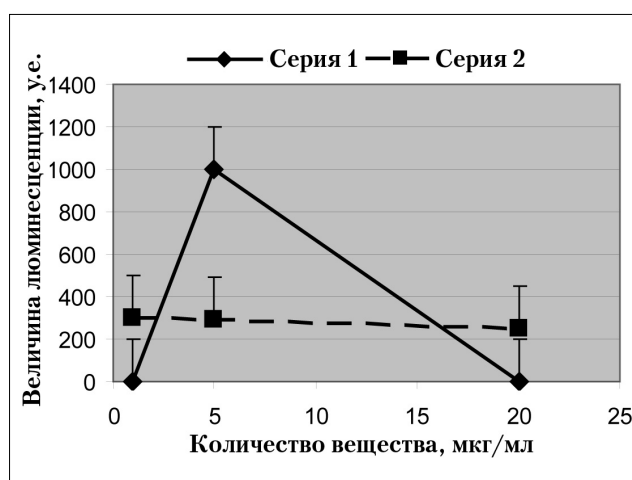


Рис. 3. Действие различных концентраций 8.7.1 на продукцию активного кислорода препаратами цельной крови доноров разного пола.

Серия 1 — препараты крови доноров мужчин ($n=4$); серия 2 — препараты крови доноров женщин ($n=3$).

Действие фракции 8.7 на выживаемость экспериментальных животных при летальной вирусной инфекции.

Исходя из всех вышеперечисленных результатов, для определения противовирусного эффекта *in vivo* взяли саму фракцию 8.7, как смесь веществ, действующих односторонне, обладающей значительно более высокой индуцирующей способностью по отношению к иммунной системе, чем отдельные вещества.

Вирус простого герпеса. Из данных, приведённых в табл. 1, следует, что введение препарата 8.7 инфицированным мышам не оказывает значимого влияния на смертность животных, как в группе

Таблица 1. Действие фракции 8.7 на выживание экспериментальных животных при инфекции вирусами разных групп

Вариант опыта	Смертность		Защита, %	СПЖ, сутки
	Отношение числа погибших животных к общему числу	%		
Группа — вирус простого герпеса				
Самцы, контроль	11/20	55	—	11,7±1,94
Самцы, препарат 8.7	12 /20	60	0	10,8±2,18
Самки, контроль	10/20	50	—	12,6±1,92
Самки, препарат 8.7	8/20	40	10	14,6*±1,79
Группа — вирус гепатита мышей				
Самцы контроль	7/10	70	—	14,8±2,4
Самцы, препарат 8.7	9/10	90	-20	12,4*±2,2
Самки, контроль	7/10	70	—	16,1±4,9
Самки, препарат 8.7	7/10	70	0	15,1±1,6
Группа — вирус энцефаломиокардита				
Самцы, контроль	7/10	70	—	6,21± 2,5
Самцы, препарат 8.7	9/10	90	- 20	4,99*±2,0
Самки, контроль	9/10	90	—	5,55±1,5
Самки, препарат 8.7	9/10	90	0	6,10±1,4

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: * — различия достоверны.

Таблица 2. Влияние препарата 8.7 на репродукцию вируса герпеса простого типа 1 в различных органах и тканях белых мышей BALB/c

	Инфекционный титр ВПГ-1, lg БОЕ/мл		
	Головной мозг	Лёгкие	Кровь
Самцы, контроль	$T_{cp}=3,27\pm0,20$	$T_{cp}=1,98\pm0,03$	$T_{cp}=1,43\pm0,09$
Самцы, опыт	$T_{cp}=3,53\pm0,11$	$T_{cp}=1,95\pm0,15$	$T_{cp}=1,50\pm0,12$
Самки, контроль	$T_{cp}=3,01\pm0,13$	$T_{cp}=1,63\pm0,03$	$T_{cp}=1,37\pm0,04$
Самки, опыт	$T_{cp}=2,08\pm0,12^*$	$T_{cp}=1,40\pm0,25$	$T_{cp}=1,20\pm0,34$

самцов, так и в группе самок. СПЖ в группе самцов, получавших препарат, была на 0,9 суток меньше, чем в контрольной группе, что указывает на тенденцию к снижению продолжительности жизни. В группе леченых самок наблюдалось достоверное увеличение СПЖ: разница по сравнению с контролем составила 2 суток (16%).

Вирус гепатита мышей. Данные, представленные в табл. 1, показывают, что в группах контроля для мышей-самцов и мышей-самок количество павших животных было одинаковым. В контроле для самцов и самок смертность животных составляла 70% при практически сопоставимой интенсивности течения ВГМ-инфекции и гибели мышей обоего пола в указанных группах.

В этих условиях в/б введения препарата 8.7 у мышей-самцов усугублялось течение инфекционного процесса с 9-го по 14-й дни после заражения, что, вероятно, и способствовало увеличению количества павших мышей по сравнению с группой контроля вируса на 20%.

В группе же мышей-самок, хотя препарат 8.7 и вызывал некоторую незначительную стимуляцию репродукции вируса у отдельных особей на начальных этапах развития заболевания, общее количество павших животных по сравнению с контролем не изменялось.

Вирус энцефаломиокардита. По совокупности полученных результатов можно отметить, что у

мышей-самцов, заражённых вирусом ЕМС, 2-кратное применение препарата 8.7 усугубляет течение инфекционного процесса и повышает уровень смертности животных.

У мышей-самок, заражённых вирусом ЕМС, 2-кратное применение препарата 8.7 не влияет на течение инфекционного процесса и не повышает уровень их смертности. Более того, наблюдается тенденция к увеличению продолжительности жизни.

Инфекционность ВПГ-1. Результаты изучения влияния препаратов на величину инфекционного титра вируса в различных органах мышей представлены в табл. 2.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что инфекционный титр ВПГ-1 в головном мозге, лёгких и крови в опытной группе самцов, получавших препарат, не был изменен по сравнению с контрольной группой самцов.

Инфекционный титр ВПГ в головном мозге в опытной группе самок, получавших препарат, снижался приблизительно на 1,0 lg БОЕ /мл по сравнению с контрольной группой. Такое различие между величинами T_{cp} является статистически достоверным при уровне значимости 95% (вероятность ошибки $\lambda=0,05$, число степеней свободы — 4). В остальном материале (лёгкие, кровь) статистически значимого снижения величины инфекционного титра вируса в опыте по сравнению с контролем не обнаружено.

Таблица 3. Влияние препарата 8.7 на размеры печени мышей при заражении ВГМ

Вариант опыта	Самцы	Самки
Контроль	26×22×1,5 мм (858 мм ³)	21×16×1,2 мм (403 мм ³)
Заражённые ВГМ	31×23×2,2 мм (1568 мм ³)	26×21×1,5 мм (819 мм ³)
Заражённые +8.7.	35×26×2,5 мм (2275 мм ³)*	26×21×1,8 мм (983 мм ³)

Таким образом, представленные в табл. 1 результаты согласуются с данными табл. 2: препарат 8.7 увеличивает среднюю продолжительность жизни самок на 2 суток и обеспечивает ингибирование репродукции ВПГ-1 в головном мозге самок (на 1,0 lg БОЕ/мл) по сравнению с контролем (см. табл. 2). Статистически значимых изменений СПЖ и величин инфекционного титра в органном материале в группе самцов по сравнению с контролем не обнаружено.

Изменение состояния органов мышей при заражении ВГМ. У здоровых незаражённых мышей-самцов ($n=2$) средний размер печени составил 26×22×1,5 мм (длина, ширина, толщина), у мышей-самок ($n=2$) — 21×16×1,2 мм (табл. 3). Печень у мышей обоего пола морфологически не изменена, имеет розовую окраску, гладкую поверхность и однородную структуру. Жёлчный пузырь менее 1 мм в диаметре, кишечник без видимых патологических изменений.

В контрольных группах животных, инфицированных ВГМ, как у самцов ($n=3$), так и самок ($n=3$) печень увеличена в размерах до 31×23×2,2 мм и 26×21×1,5 мм соответственно, с очаговыми некротическими поражениями ($n=2$ у самцов и самок) и застойными сосудистыми тяжами ($n=1$ у самцов и самок). Структура печени рыхлая ($n=3$ у самцов и самок). Жёлчный пузырь увеличен до размеров 1—1,5 мм в диаметре ($n=2$ у самцов и самок) или 2—2,5 мм ($n=1$ у самцов и самок). В кишечнике определяется умеренная гиперемия ($n=2$ у самцов и самок) или выраженная гиперемия и узловатость ($n=1$ у самцов и самок).

В группах животных, инфицированных ВГМ и получавших препарат 8.7 (самцов $n=1$, самок $n=3$), увеличен размер печени и достигает в среднем 35×26×2,5 мм у самцов и 26×21×1,8 мм у самок, что на 4×3×0,3 мм больше, чем в контроле вируса у самцов и практически не отличается от размеров печени у самок в группе контроля вируса. У самцов печень утолщена, гиперемирована, имеются застойные тяжи сосудов. У самок гиперемия печени, очаговые поражения и тяжи сосудов менее выражены ($n=2$), но структура печеночной ткани рыхлая ($n=2$).

Жёлчный пузырь у оставшихся в живых самца и самок данной группы увеличен до 2—2,5 мм в диаметре.

Кишечник самца выражено гиперемирован, имеется узловатость. У самок преобладает незначительная гиперемия кишечника без других патологических изменений.

Таким образом, наихудшие и выраженные признаки ВГМ-инфекции в печени, жёлчном пузыре и кишечнике определялись в группе мышей-самцов, получавших препарат 8.7. У мышей-самок, получавших препарат 8.7, признаки гепатита мышей по сравнению с таковыми у самцов оказались менее выраженными. Суммируя результаты проведённых исследований, можно отметить, что препарат 8.7 усугубляет течение ВГМ-инфекции у мышей-самцов и повышает уровень их смертности. Применение препарата 8.7 у мышей-самок, заражённых ВГМ, не изменяет уровень их смертности по сравнению с группой контроля вируса и достоверно не влияет на физиологическое состояние органов по сравнению с группой заражённых вирусом мышей.

Таким образом, влияние фракции 8.7 на величину инфекционного титра ВПГ в органах заражённых мышей и сравнительное изучение органов ЖКТ, поражённых ВГМ, у мышей, не леченых (контроль) и получавших препарат, подтверждают данные о гендерной зависимости этого препарата на вирусные инфекции.

Обсуждение результатов

У группы веществ, объединённых во фракцию 8.7, не обнаружено непосредственного противовирусного и собственного вирус-стимулирующего действия в культуре клеток *Vero* для ВПГ-1. Вместе с тем в препаратах крови мужчин и женщин обнаружено разнонаправленное действие этих веществ на клетки иммунной системы. Следовательно, все изменения в репликации вирусов под действием 8.7 *in vivo*, носящие гендерный характер, по-видимому, связаны с различными реакциями на эту группу веществ в иммунной системе животных разного пола. Действие на иммунную систему не может быть связано с наличием в препарате половых гормонов, которые модифицируют сигналы иммуномодуляторов на стадии рецепции [9], или опосредованным влиянием через воздействие на щитовидную железу и экскрецию её гормонов. Фракция не содержит ни стероидных, ни тиреоидных гормонов, так как прошла обработку хлороформом (см. Материал и методы), с помощью которой удалены все гидрофобные вещества. Следовательно, получены вещества, которые имеют различное сродство к рецепторам на мужских и женских нейтрофилах или различное количество этих рецепторов. При этом активация клеток иммунной системы влияет на противовирусную защиту организма *in vivo*.

Одним из наиболее интересных моментов является блокирование активации НАДФН-оксидазы в нейтрофилах из крови мужчин форболовым эфиром. Это вещество является одним из самых сильных активаторов НАДФН-оксидазы [10], причем активация осуществляется при участии протеинкиназы С. Следовательно, под действием веществ из фракции 8.7 у мужчин и самцов животных перекрывается именно этот путь активации иммунной системы. Так как вещества гидрофильные, прямое их действие на какую-нибудь протеинкиназу или протеинфосфатазу, как в слу-

чае водорослевого яда — оокадаевой кислоты [11], можно не рассматривать. Наиболее вероятной является возможность воздействия на какой-то из клеточных рецепторов. Наличие его у самцов и отсутствие или инактивация у самок и может быть причиной гендерных различий действия веществ фракции 8.7. Сами вещества из фракции 8.7 обладают низкой противовирусной активностью, однако открытие и изучение данного феномена может привести к открытию препаратов, например, для борьбы с вирусными инфекциями при беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Татарчук Т.Ф., Чернышов В.П., Исламова А.О. Половые стероидные гормоны и иммунная система. Эндокринная гинекология. Киев: Заповіт 2003; 181—199.
2. Bouman A., Heineman M.J., Faas M.M. Sex hormones and the immune response in humans. *Human Reproduction Update* 2005; 11: 4: 411—423.
3. Fairweather D., Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun* 2009; 33: 3—4: 222—230.
4. Cutolo M., Serio B., Villaggio B., Pizzorni C., Cravotto C., Sulli A. Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 131—142.
5. Reddy J., Waldner H., Zhang X., Illes Z., Wucherpfennig K.W., Sobel R.A., Kuchroo V.K. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005; 175: 9: 5591—5595.
6. Мальдов Д.Г., Бельков А.П., Ильичев А.В., Асташкин Е.И. Влияние комплексного гидрофильного низкомолекулярного препарата «Стимфорте» на функциональную активность фагоцитов крови человека. *Иммунология* 2009; 2: 95—97.
7. Rubtsova K., Marrack P., Rubtsov A.V. Age-associated B cells: are they the key to understanding why autoimmune diseases are more prevalent in women? *Expert Rev Clin Immunol* 2012; 8: 1: 5—7.
8. Андреева В.Л., Гроховский С.Л., Сурова А.Н., Гурский Г.В., Галегов Г.А. Действие димерных производных нетропсина и их комбинаций с ацикловиром на герпесвирусную инфекцию мышей. Доклады Академии Наук, 2007; 413: 6: 1—5.
9. Calippe B., Douin-Echinard V., Delpy L., Laffargue M., Lélou K., Krust A., Pipry B., Bayard F., Arnal J.F., Guéry J.C., Gourdy P. 17-Beta-estradiol promotes TLR4-triggered proinflammatory mediator production through direct estrogen receptor alpha signalling in macrophages *in vivo*. *J Immunol* 2010; 185: 2: 1169—1176.
10. Rubtsov A.V., Rubtsova K., Kappler J.W., Marrack P. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 7: 494—498.
11. Newell S.W., Perchellet E.M., Gao X.M., Chen G., Perchellet J.P. Ability of okadaic acid and other protein phosphatase inhibitors to mimic the stimulatory effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on hydroperoxide production in mouse epidermis *in vivo*. *Cancer Lett* 1996; 98: 2: 241—251.

Применение Циклоферона при лечении герпесвирусной инфекции

Л. М. АЛИМБАРОВА

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» МЗ РФ, Москва

Cycloferon and Management of Herpes Virus Infection

L. M. ALIMBAROVA

D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Moscow

При лечении больных с различными формами герпесвирусных инфекций (ГИ) необходимо использование комплексного подхода, предусматривающего применение как химио-, так и иммуотропных препаратов. Установлена эффективность применения Циклоферона® (12,5% раствор для инъекций, таблетки по 150 мг и 5% линимент) — индуктора интерферона, оказывающего противовирусное и иммуномодулирующее действие в моно- и комбинированной терапии простого герпеса кожи и слизистых оболочек, генитального герпеса, офтальмогерпеса, опоясывающего герпеса, инфекционного мононуклеоза. Применение Циклоферона® снижало выраженность и длительность проявления клинических симптомов заболевания, увеличивало ремиссию, корректировало изменения в иммунитете, предупреждало развитие осложнений. Полученные результаты являются убедительным основанием для рекомендации широкого использования данной методики в практическом здравоохранении.

Ключевые слова: герпесвирусная инфекция, лечение, аналоги нуклеозидов, индукторы интерферона, Циклоферон®.

The treatment of patients with various forms of herpes requires a complex approach with using chemo- and immunotropic drugs. The use of Cycloferon, an interferon inducer (12.5% injection solution, 150 mg tablets or 5% liniment) was shown efficient. It had antiviral and immunotropic action in the mono- and combination therapy of herpes simplex of the skin and mucosa, genital herpes, ophthalmoherpes, herpes zoster, infectious mononucleosis. Cycloferon lowered the level and period of the disease clinical signs, prolonged the remission, corrected the immunity shifts, prevented the complications. The results of the study presented a conclusive proof for recommending such a use of Cycloferon in wide medical practice.

Key words: herpes, treatment, nucleoside analogs, interferon inducers, Cycloferon.

Проблема герпесвирусных инфекций (ГИ) на протяжении последних лет не теряет своей актуальности. Несмотря на существенные достижения в изучении этиологии, патогенеза и терапии ГИ, последние продолжают оставаться одними из наиболее распространённых инфекционных заболеваний человека [1–4]. Основными возбудителями ГИ являются представители семейства *Herpesviridae* — вирусы простого герпеса — ВПГ-1 и ВПГ-2 антигенного типа, вирус ветряной оспы, вирус опоясывающего лишая, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), а также вирусы герпеса человека 6-, 7- и 8-го типов. Все вирусы герпеса при определённых условиях могут вызывать различные по локализации и выраженности патологические процессы, которые характеризуются склонностью к персистенции и периодическим обостре-

ниям на фоне триггерных факторов, индивидуальных для каждого больного.

Триггерными факторами реактивации ГИ являются: снижение местной или общей реактивности организма, изменение гормонального фона, сопутствующие инфекции, обусловленные иными инфекционными агентами, онкологические заболевания, приём иммунодепрессантов и т. д. Клиническая манифестация ГИ наблюдается у 20–30% инфицированных, в то время как бессимптомные или асимптомные формы заболевания встречаются у 70–80% [3, 4]. И именно больные со стёртыми, бессимптомными формами заболевания, а также вирусоносители являются основным резервуаром инфекции.

Отличительной особенностью вирусов герпеса является также пантропность и способность при длительной персистенции вызывать подавление функциональной активности различных звеньев иммунной системы и индуцировать формирование вторичного иммунодефицита [4]. При снижении иммунореактивности организма, осо-

© Л. М. Алимбарова, 2014

Адрес для корреспонденции: 123098.Москва, ул.Гамалеи, д. 16. НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского

бенно у лиц с дефектами в клеточном звене иммунитета, вирусы герпеса могут выступать в качестве вирусов-оппортунистов, приводя к развитию заболевания с необычными клиническими проявлениями, длительным и тяжёлым течением, а также к летальному исходу [4].

В настоящее время основными направлениями в лечении и профилактике ГИ являются химиотерапия, иммунотерапия либо комбинация этих методов [1–4]. При выборе метода лечения учитывают патогенетические особенности, форму, тяжесть заболевания, сроки проведения терапии, состояние иммунитета. Этиотропная химиотерапия ГИ предусматривает применение препаратов, оказывающих прямое противовирусное действие. Среди химиопрепаратов наиболее часто применяются близкие по структуре препараты из группы ациклических нуклеозидов — Ацикловир (АЦВ) и его производные — Валацикловир (Валтрекс), Фамцикловир (Фамвир) [1–4]. Все аналоги нуклеозидов обладают низкой токсичностью, имеют близкий механизм действия и клиническую эффективность, ингибируют синтез ДНК у вирусов герпеса, находящихся в стадии репродукции, но не действуют на вирусы, находящиеся в латентном состоянии. Общим недостатком ациклических нуклеозидов является неспособность полностью элиминировать вирус из организма, корригировать показатели иммунитета. Кроме того, возможно появление резистентных форм вирусов герпеса на фоне их применения [1, 4].

Иммунотерапия предусматривает применение иммуномодуляторов, интерферона (ИФН) и его индукторов, а также иных препаратов, действие которых направлено на активацию естественного иммунитета, системы цитокинов, фагоцитоза [3, 4]. В терапии ГИ применяют иммуномодуляторы тимусного, костномозгового происхождения, синтетические аналоги эндогенных веществ и др. ИФН и его индукторы являются препаратами нового направления лечения ГИ и применяются как при сдвигах в системе иммунитета в целом, так и при нарушениях местного иммунитета [2–5]. Применение ИФН в терапии ГИ обусловлено наличием у него иммуномодулирующей и противовирусной активности. Однако системное применение препаратов ИФН приводит к развитию резистентности к применяемым дозам и ряду побочных эффектов, которые ограничивают их широкое применение в медицинской практике [3, 4].

Лишены вышеперечисленных недостатков индукторы ИФН, типичными представителями которых являются природные полимеры дс-РНК (Ридостин), низкомолекулярные природные растительные полифенолы (Кагоцел), синтетические высокомолекулярные полимеры (Полудан), синтетические низкомолекулярные

акриданоны (Циклоферон, Неовир) [3, 4]. Имея основные свойства ИФН, индукторы не обладают антигенностью, даже при однократном введении обеспечивают длительную циркуляцию синтезированных цитокинов на терапевтическом уровне. Стимулированный ими синтез эндогенного ИФН не вызывает гиперинтерферонемии и развития связанных с ней побочных эффектов. Индукторы ИФН хорошо сочетаются с химиопрепаратами, вакцинами и ИФН, усиливая действие последних и уменьшая побочные эффекты при их применении [4–6]. Однако при назначении индукторов ИФН следует учитывать, что у пациентов ответ системы интерфероногенеза на их введение индивидуален, варьирует по силе и времени ответа. Длительный приём индукторов ИФН, больше рекомендованного, может приводить к гипореактивности системы интерфероногенеза [7].

Среди индукторов ИФН в комплексной терапии ГИ широкое применение в последнее десятилетие получил низкомолекулярный синтетический индуктор интерферона Циклоферон® (ООО «НТФФ «Полисан») [2–6]. Циклоферон (меглумина акридоната) является производным акридинуксусной кислоты, обладает широким спектром биологической активности: оказывает иммуномодулирующее, противовирусное, противовоспалительное действие. Препарат выпускается в трёх лекарственных формах: в виде 12,5% раствора для инъекций, в виде таблеток по 0,15 г, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, и 5% линимента для наружного применения. При введении в организм Циклоферон индуцирует синтез раннего эндогенного интерферона α/β -типа. Основными клетками — продуцентами ИФН после введения препарата являются макрофаги, Т- и В-лимфоциты. По данным ряда авторов, Циклоферон обладает прямым и опосредованным (через выработку ИФН) иммуностропным эффектом [4, 6]. Препарат повышает уровень ИФН в органах и тканях, содержащих лимфоидные элементы, активирует стволовые клетки костного мозга, стимулирует образование гранулоцитов, преодолевает гематоэнцефалический барьер. Циклоферон активирует Т-лимфоциты и NK-клетки, нормализует баланс между CD4+ и CD8+ клетками, снижает уровень В лимфоцитов в периферической крови, но повышает синтез высокоаффинных антител, активирует фагоцитоз, а также стимулирует активность α -ИФН. Преимуществом Циклоферона по сравнению с другими синтетическими препаратами с полифункциональной активностью является низкая токсичность, быстрое проникновение в кровь, высокая биодоступность. Циклоферон быстро выводится из организма: 99% препарата элиминирован почками в неизменённом виде в течение

ние 24 ч. Интерферогенная активность сохраняется в течение 3 суток [4, 6].

Эффективность и безопасность Циклоферона® с позиций доказательной медицины подтверждена во многих российских исследованиях.

Результаты экспериментального исследования циклоферона

В экспериментах *in vitro* на модели ГИ при заражении культуры клеток VERO ВПГ-1 было установлено, что Циклоферон достоверно подавляет репродукцию ВПГ-1 и снижает в 8–16 раз инфекционную активность вирусного потомства по сравнению с контролем. На примере модели ГИ было показано, что Циклоферон нарушает репродуктивный цикл ВПГ опосредованно через индукцию синтеза эндогенного ИФН, приводя к формированию дефектных интерферирующих частиц в инфицированных клетках, которые не способны заражать здоровые клетки. Также было показано, что комбинация Циклоферона с АЦВ приводит к синергидному эффекту в отношении ВПГ [4].

В экспериментах *in vivo* на модели ГИ у мышей, морских свинок и кроликов было установлено, что Циклоферон обладает достоверной противовирусной и иммуномодулирующей активностью. На модели ГИ у мышей BALB/c, заражённых внутрибрюшинным введением ВПГ-1, было установлено различие в эффективности препарата в зависимости от состояния иммунной системы [8]. У инфицированных мышей Циклоферон индуцирует синтез сывороточного ИФН в высоком титре, синтез ИЛ-2 и γ -ИФН, но снижает уровень ИЛ-1b. На фоне иммуносупрессии, вызванной у инфицированных мышей γ -облучением или введением циклофосфамида, препарат приводит к подавлению синтеза сывороточного ИФН в 4–8 раз, синтеза ИЛ-2 и ИЛ-1b, но не влияет на синтез γ -ИФН. Эффективность Циклоферона у мышей с генерализованной ГИ составляет 30–100% [8].

На модели герпетического кератита у кроликов, вызванного ВПГ-1, штамм «ЕС», было показано, что Циклоферон (в виде глазных капель) обладает эффективностью, сравнимой с таковой у референс-препарата — индуктора ИФН — препарата Полудан [9]. Лечение Циклофероном начинали через три дня после заражения: препарат вводили в конъюнктивальную полость 6 раз в день. Применение Циклоферона приводило к достоверному снижению выраженности клинических проявлений конъюнктивита и кератита, препятствовало генерализации инфекции, снижая в 2 раза смертность кроликов по сравнению с инфицированными животными, получавшими 20% раствор сульфацил-натрия (сульфацетамида) по аналогичной схеме. На фоне терапии Циклофе-

роном процессы васкуляризации и обратного развития сосудов в роговице у животных наступали раньше, чем при использовании препарата Полудан. Отёк и гиперемия конъюнктивы были купированы через 14,2 суток, в то время как на фоне Полудана — через 22,0 суток, на фоне сульфацил-натрия — через 29,5 суток. Циклоферон, так же как и Полудан, нормализовал уровни ИФН в слёзной жидкости и сыворотке крови. Следует отметить, что по результатам титрования материала (смывы с роговицы глаза), взятого в период с 4-х по 25-е сутки после заражения, ни Циклоферон, ни Полудан не оказывали достоверного влияния на уровень репродукции вируса в тканях глаза и продолжительность его экскреции по сравнению с контролем [9].

По данным эксперимента, проведённого в НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского, на модели генитального герпеса (ГГ) у самцов аутбредных морских свинок, вызванного ВПГ-2, штамм «ВН», было установлено, что Циклоферон (5% линимент) обладает достоверной терапевтической эффективностью, выраженность которой зависит от сроков применения препарата. Наиболее значимые результаты были получены при использовании препарата по лечебной схеме через 3 часа после инфицирования 5 раз в сутки в течение 5 дней. Применение Циклоферона приводило к статистически достоверному терапевтическому эффекту, снижению в 1,5 раза выраженности симптоматики и значительному сокращению средней продолжительности заболевания (СПЗ) по сравнению с аналогичными показателями у животных, не получавших лечения. Индекс лечебного действия (ИЛД) составил 42,64%, СПЗ — $11,0 \pm 1,0$ суток. Животные, леченные Циклофероном, выздоравливали в среднем на 5,0 суток раньше, чем те, которые не получали лечения ($16,0 \pm 1,75$ суток). Инфекционный процесс характеризовался наличием умеренно выраженных экссудативно-воспалительных явлений, сокращением сроков разрешения высыпаний. Значимых различий между показателями эффективности Циклоферона и референс-препарата Зовиракс® (5% крем ацикловира), используемого по аналогичной схеме, выявлено не было. ИЛД Зовиракса составил 45,29%, СПЗ — $8,57 \pm 0,57$ суток. По результатам титрования материала (содержимое везикул, отделяемое эрозивно-язвенных элементов), взятого на 2–11-е сутки после заражения, достоверного влияния Циклоферона на уровень репродукции вируса и продолжительность его экскреции по сравнению с контролем установлено не было. Использование линимента Циклоферона на фоне выраженных проявлений патологического процесса (через 48 часов после заражения) по аналогичной лечебной схеме также приводило к достоверной динамике регресса кли-

нических проявлений, но менее выраженной по сравнению с первой схемой применения (СПЗ $13,0 \pm 1,25$ суток).

Результаты исследований Циклоферона на экспериментальных моделях ГИ позволили установить, что препарат обладает высокой эффективностью и хорошо переносится животными, не вызывая побочных эффектов. Экспериментальные данные были в дальнейшем подтверждены результатами многочисленных клинических исследований, в том числе многоцентровых, открытых, рандомизированных и постмаркетинговых, а также данными, полученными в условиях врачебной практики.

Результаты клинических исследований Циклоферона

Позитивное влияние Циклоферона было установлено при лечении больных с офтальмогерпесом (ОФТГ), который является одной из актуальных проблем практической офтальмологии, характеризуется полиморфной клинической картиной и часто сопровождается развитием осложнений, приводящих к снижению зрительных функций, развитию катаракты и слепоты [4, 10, 11]. По данным ряда авторов, у больных с ОФТГ эффективность Циклоферона варьирует от 67,0 до 94,4% [4, 11]. Циклоферон назначали либо в моноварианте в виде 5 внутримышечных инъекций через день, либо в составе комплексной терапии (КТ) в виде 5—7 внутривенных введений через день и эндоназально методом электрофореза с положительного полюса через день в течение 10 суток. Независимо от схемы применения Циклоферон приводил к уменьшению выраженности клинической симптоматики, сокращению СПЗ, предотвращал развитие осложнений, способствовал нормализации уровня ИФН в слезной жидкости и сыворотке крови, а также повышению активности НК-клеток, исходно сниженной у больных ОФТГ. Повышение остроты зрения было отмечено у 91,6% больных, получавших комплексную терапию, и у 12% больных, получавших стандартную терапию [11].

Была показана возможность применения Циклоферона у больных с часто рецидивирующим ОФТГ для профилактики рецидивов заболевания в сочетании с противогерпетической вакциной. С целью повышения эффективности вакцинации Циклоферон назначали внутримышечно либо за неделю до введения вакцины, либо одновременно с вакциной [4].

Рядом авторов была продемонстрирована эффективность применения Циклоферона (12,5% раствор, таблетки 0,15 г, 5% линимент) при рецидивирующей ГИ кожных покровов и слизистых оболочек различной локализации, являющихся

наиболее частыми формами заболевания [3—5, 7—21]. В России герпетическое поражение кожи встречается у 15% населения, генитальный герпес — у 6—10% взрослых.

Эффективность инъекционной формы препарата Циклоферон была установлена при рецидивирующей ГИ средней степени тяжести, в том числе при лабиальном простом герпесе, герпесе лица, ГГ у пациентов с давностью заболевания — от 2 до 7 лет при частоте рецидивов от 1—2 раз в месяц до 4—5 раз в год [4, 6]. Циклоферон назначали в виде 5 инъекций внутримышечно через день. Эффективность Циклоферона составила 82,4% по сравнению с 70% в случае референс-препарата Зовиракс, который использовали внутрь по 0,2 г 5 раз в день в течение 5 дней ($p < 0,05$).

В другом исследовании была показана эффективность длительного или прерывистого курсового введения препарата (внутримышечно 5 инъекций через день, затем 5 инъекций через 48 часов, затем 10 инъекций 1 раз в неделю либо в/м 10 инъекций через день, затем повторный курс из 5 или 7 инъекций через 10—12 дней) [4]. Стойкое улучшение самочувствия, исчезновение субъективных симптомов отмечали со второго дня терапии; увеличение продолжительности ремиссии в 2,5 раза — у 80% больных, получавших Циклоферон, и у 85% — получавших АЦВ по стандартной схеме.

Независимо от схемы применения, после окончания лечения отмечали выраженный интерферогенный эффект Циклоферона: усиление продукции лейкоцитами крови α -ИФН в среднем в 3,6 раза (с $46,7 \pm 2,6$ МЕ/мл до $170,0 \pm 0,2$ МЕ/мл) и γ -ИФН — в 3,2 раза (с $13,3 \pm 1,3$ МЕ/мл до $42,7 \pm 2,51$ МЕ/мл), тенденцию к нормализации показателей Т-клеточного иммунитета и гемограммы [4, 6].

У больных с рецидивирующей ГИ тяжёлого течения эффективность Циклоферона оценивали по изменению показателей бактерицидности нейтрофилов, так как нейтрофилы и макрофаги являются одними из клеток-мишеней для данного препарата [12]. Циклоферон назначали из расчёта 5 мг/кг один раз в 3 дня, 10 инъекций. Установлено, что Циклоферон оказывал модулирующее действие на показатели функциональной активности нейтрофилов в тестах *in vivo* и *in vitro*, в большей степени — на фагоцитарную функцию нейтрофилов, а также на кислородзависимую и кислороднезависимую бактерицидность нейтрофилов, исходно сниженную у 72,3 и 81,5% больных, соответственно.

У больных с рецидивирующей ГИ или генитальным герпесом (ГГ) была также продемонстрирована возможность сочетанного применения Циклоферона с препаратами ИНФ-иммуномодуляторами. При назначении Циклоферона (12,5%

раствор) с Вифероном (рекомбинантный ИФН- α 2 в суппозиториях), либо с Панавиром (экстракт побегов *Solanum tuberosum* — 0,04 мг/мл, раствор для внутривенного введения) достоверный положительный эффект отмечали в среднем на 6-е сутки от начала лечения, по сравнению с 8-и сутками у больных, получавших 5% крем Зовиракса [4, 6, 13].

Высокая фармакотерапевтическая и экономическая эффективность комплексного применения Циклоферона со стандартной терапией этиотропными химиопрепаратами (АЦВ) была установлена у больных с рецидивирующим ГГ. Циклоферон (12,5% раствор) назначали внутримышечно — 7 инъекций в комбинации с АЦВ по 0,2 г 5 раз в день в течение 5 дней. Эффективность комплексной терапии (КТ), по данным разных авторов, составила 73,5–97,4%, монотерапии Циклофероном — 72,3–78,0%. При сопоставимой эффективности двух схем лечения монотерапия была менее затратной: показатель «затраты/эффективность» у Циклоферона составил 12,98%, а у КТ — 27,95%. Необходимо отметить, что эффективность Циклоферона® была одинаковой у генетически гетерогенных пациентов: как с наличием гена *GSTM1*, кодирующего глутатион-S-трансферазу, так при его делеции [3, 14].

В другом исследовании с участием 111 женщин в возрасте от 18 до 56 лет с рецидивирующим ГГ, с частотой рецидивов 6–9 раз в год, получавших КТ индукторами ИФН (Циклоферон, Йодантипирин, Амиксин) в сочетании с АЦВ были выявлены различия в эффективности в зависимости от клинического эффекта [15]. У пациенток с клиническим эффектом лечения, проявляющимся снижением частоты рецидивов, индукторы ИФН индуцировали синтез цитокинов неспецифического иммунного ответа (α -ИФН, β -ИФН, ФНО- α) и Th1 профиля (γ -ИФН, ИЛ-2), приводили к снижению уровня ИЛ-10 в течение 1,5–3 месяцев после начала приёма препарата. Характерной особенностью Циклоферона было повышение в крови уровня ФНО- α , Йодантипирина — уровня α -ИФН, Амиксина — уровня γ -ИФН. У пациенток с отсутствием терапевтического эффекта — индукторы ИФН индуцировали синтез невысоких уровней провоспалительных цитокинов (α -ИФН, γ -ИФН, ИЛ-2) в крови в течение 1,5 месяцев после начала лечения и стабильно высокие уровни ИЛ-10.

Эффективность сочетанного применения Циклоферона со стандартной терапией (АЦВ, антибиотики, ИФН и др.) была также установлена при рецидивирующих заболеваниях урогенитального тракта смешанного генеза [3, 4]. Пациентам со смешанной хламидийно-герпесвирусной инфекцией, в возрасте 19–43 лет, Циклоферон назначали внутримышечно в виде 10 инъекций с интервалом в 48 часов, химиопрепараты — в

соответствии с этиологией заболевания со 2-го дня лечения. На фоне КТ отмечали выраженный противовоспалительный эффект Циклоферона, обусловленный усилением функциональной активности нейтрофилов и активацией фагоцитоза. Клиническая эффективность была достигнута в 68,85% случаев.

В ряде исследований было продемонстрировано преимущество поэтапного проведения КТ у больных с микстинфекцией [4, 5]. Так, на первом этапе больные получали рекомбинантный ИФН внутримышечно 2 млн ЕД одновременно с Зовираксом внутрь по 0,2 г 5 раз в сутки в течение 10 дней и Циклоферон (12,5% раствор) внутримышечно 5 инъекций через день. Второй этап лечения назначали сразу после первого: Циклоферон (12,5% раствор) внутримышечно — 5 инъекций через сутки одновременно с Доксидоксином (0,1 г 3 раза в сутки) или Рулидом (0,15 мг 2 раза в сутки) в течение 10 дней. После окончания двух курсов лечения стойкая клинико-иммунологическая ремиссия установлена у 63,6% больных.

В другом исследовании с участием 100 больных с тяжёлой формой рецидивирующего ГГ была показана возможность применения Циклоферона в составе КТ с целью профилактики рецидивов заболевания и повышения эффективности вакцинации. На первом этапе больные получали одновременно Циклоферон + Фамвир + антиоксиданты, на втором этапе больным была проведена вакцинотерапия. По итогам первого этапа увеличение ремиссии в 2–3 раза было установлено у 85% пациентов. Проведение вакцинотерапии привело к продолжительной клинической ремиссии и значительному улучшению качества жизни больных. [5].

Эффективность применения таблетированной формы Циклоферона в сочетании с АЦВ была установлена в рандомизированном исследовании с участием 125 пациентов в возрасте от 18 до 60 лет, с различными формами рецидивирующей ГИ, в том числе с лабиальным простым герпесом, с ГГ, с сочетанной формой ГИ при продолжительности заболевания от 1 года до 16 лет [16]. Циклоферон назначали внутрь по 2 таблетки один раз в сутки на 1-, 2-, 4-, 6-, 8-, 11-, 14-, 17-, 20-, 23-, 26- и 29-й дни лечения одновременно с АЦВ по стандартной схеме. У больных с положительным эффектом (>85%) отмечали достоверное повышение цитотоксической активности НК-клеток, показателей α/β -ИФН, в меньшей степени γ -ИФН.

Эффективность сочетанного применения Циклоферона с этиотропными препаратами установлена также при поражении нервной системы, в частности при острой и хронической формах энцефалита [4]. Циклоферон назначали внутримышечно в виде 10 инъекций (первые две — с ин-

тервалом в 24 часа, последующие — с интервалом 48 часов) одновременно с Виролексом внутривенно из расчёта 10 мг/кг 3 раза в сутки ежедневно в течение 5–7 дней или внутрь по 800 мг 5 раз в сутки в течение 10 дней. КТ приводила к положительному эффекту у всех больных и способствовала достоверному улучшению у них иммунологических показателей по сравнению с пациентами, получавшими стандартную терапию Виролексом: отмечалось увеличение уровня CD4-лимфоцитов, NK-клеток, продукции цитокинов, повышение функциональной активности гранулоцитов.

Одной из важнейших составных частей комплексной терапии ГИ были и остаются лекарственные формы препаратов для наружного применения. Эффективность 5% линимента Циклоферона (лЦК) при рецидивирующей ГИ, в том числе при орофациальном герпесе (ОФГ), при герпетическом стоматите (ГС), при ГГ, при сочетанной форме заболевания (ОФГ+ГГ), при аногенитальном герпесе и при опоясывающем герпесе (ОГ) установлена у взрослых и детей в возрасте от 3 до 75 лет [3, 4, 17–20].

Назначение 5% лЦК при данных формах ГИ патогенетически оправдано, так как ранее было установлено, что у больных с ГИ наряду с системным иммунодефицитом наблюдается и местный иммунодефицит, который создает предпосылки для незавершённого фагоцитоза вируса, уменьшения продукции и функциональной активности α -ИФН [4]. В период ремиссии вирус сохраняется в клетках в виде провируса, интегрированного в геном клетки, в то время как полный цикл репродукции вируса и выход полноценных вирионов происходит в эпителиальных клетках, т. е. в процессе формирования везикул, когда вирус проявляет цитопатогенные свойства.

5% лЦК, в состав которого входит также антисептик катапол в концентрации 0,1%, при простом герпесе кожи и ОГ наносят на область поражения 5 раз в сутки в течение 5–10 дней или до полного исчезновения симптомов заболевания; при герпетических стоматитах (ГС), а также при пародонтите — 2 раза в сутки по 20 мин с интервалом 10–12 ч в течение 14 дней. Возможно применение линимента 2 раза в сутки в течение 5 дней одновременно с АЦВ внутрь в дозе 0,2 г 5 раз в сутки в течение 5 дней [3, 4, 17, 18].

Эффективность лЦК составила 85% vs 25% у больных, получающих стандартную терапию. У больных с ГГ эффективность линимента была несколько ниже. Назначение 5% лЦК при простом герпесе и аногенитальном герпесе приводило к быстрому регрессу клинических проявлений, местного воспаления, ускорению эпителизации, значительному уменьшению длительности рецидива. Эффективность 5% лЦК была сравнима с

эффективностью референс-химиопрепаратов (Зовиракс, Виролекс, Герперакс — 5% кремы, Триаптен — 2% крем) [3, 4, 19].

Применение 5% лЦК в КТ пародонтита, рецидивирующего ГС, в том числе у больных с хроническими заболеваниями вирусно-бактериальной природы (тонзиллитом, с латентной формой ВИЧ-инфекции), позволило снизить выраженность и продолжительность клинических проявлений, локального воспалительного процесса за счёт нормализации показателей местного иммунитета, увеличить длительность ремиссии до 6 мес [4, 18, 20, 21]. По сравнению со стандартной терапией применение лЦК приводило к нормализации уровня γ -ИФН в жидкости зубодесневых карманов, снижению уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-1 β , ФНО- α , переключению непродуктивного Th2 типа воспаления иммунного ответа на продуктивный Th1 ответ [4, 20]. Необходимо отметить, что Циклоферон является единственным препаратом, позволяющим нормализовать уровни γ -ИФН в жидкости зубодесневых карманов. Назначение лЦК способствовало также нормализации показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантного потенциала крови, уменьшению инфекционной нагрузки в полости рта (ВПГ-1, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*) [21].

Как известно, опоясывающий герпес (ОГ) часто выявляется на фоне иммунодефицитного состояния при ВИЧ-инфекции и отличается тяжёлым течением, обширными поражениями, отсутствием эффекта от проводимой терапии. Ряд авторов показали эффективность Циклоферона (5% линимент, таблетки) в комплексной терапии ОГ у ВИЧ-инфицированных в стадии IIIA, на фоне выраженного снижения показателей Т-клеточного иммунитета (Т-лимфоцитов, фагоцитарной активности макрофагов) [4]. Циклоферон назначали внутрь по 600 мг/сут в течение 7 дней и одновременно 5% лЦК местно на область поражения. На фоне КТ отмечали быстрое уменьшение субъективных ощущений, регресс клинических проявлений, нормализацию температуры на 3-й день лечения, исчезновение болевого синдрома на 6–8-е сутки, уменьшение лимфоаденопатии на 7-е сутки. Высыпание новых элементов сыпи прекратилось со вторых суток лечения, полная регрессия элементов сыпи завершилась к 14-му дню лечения. Была отмечена значительная положительная динамика иммунологических показателей: повышение уровня CD4-лимфоцитов и повышение фагоцитарной активности нейтрофилов.

Таким образом, сравнительный анализ различных схем лечения больных с ГИ показал преимущество комплексного применения препаратов с разным механизмом действия. Установлено,

что КТ позволяет достигать большей клинической эффективности: снижать выраженность клинических симптомов, приводить к увеличению длительности ремиссии на фоне тенденции к нормализации показателей иммунного и интерфероновому статусу.

Установлена эффективность Циклоферона (12,5% раствор, таблетки, суппозитории) в сочетании со стандартной терапией при инфекционном мононуклеозе (ИМ) — одной из распространенных форм заболевания, вызываемого ЭБВ, характеризующегося полиморфной клинической картиной, лихорадкой, генерализованной лимфаденопатией, тонзиллитом, гепатоспленомегалией, специфическими изменениями в иммунограмме [4, 22—25]. Детям в возрасте от 1 до 15 лет с ИМ средней степени тяжести препарат назначали по разным схемам, в том числе: внутримышечно из расчета 6 мг/кг, 8 инъекций (первые две инъекции — с интервалом в 24 часа, последующие — с интервалом в 48 часов [22]; внутримышечно из расчета 10 мг/кг 1 раз в сутки в течение 10 дней [23]; в/м или перорально в течение 10 дней в зависимости от возраста [24]; или внутримышечно и *per rectum* в случае использования суппозиториев [25]. Установлено, что Циклоферон независимо от вида лекарственной формы приводил к значимому снижению выраженности интоксикации, лимфаденопатии, гепатомегалии ($p < 0,05$), нормализации гематологических показателей. На фоне КТ отмечали существенное уменьшение количества атипичных мононуклеаров (менее 10%) на 6-й день болезни (у детей, получавших стандартную терапию — на $14,7 \pm 0,2$ день); снижение периода репликации ВЭБ на 2,6 сут по сравнению с показателем у детей кон-

трольной группы ($4,2 \pm 0,5$ vs. $6,8 \pm 0,3$ сут). Применение Циклоферона предотвращало у детей развитие осложнений, ОРВИ в период выздоровления и сокращало сроки госпитализации. Способность Циклоферона предотвращать развитие ОРВИ обусловлена его полифункциональной активностью, способностью подавлять репродукцию широкого спектра вирусов, в том числе ортомиксовирусов, парамиксовирусов, аденовирусов, коронавирусов, являющихся наиболее частыми этиологическими агентами ОРВИ. В настоящее время Циклоферон используется при экстренной профилактике ОРВИ и гриппа у детей и подростков в период повышенного подъема заболеваемости [26]. Циклоферон назначают внутрь до еды по 1—2 таблетки на прием (в зависимости от возраста и состояния иммунитета) коротким или длительным курсом по стандартной схеме. Учитывая то, что вирусы герпеса могут поражать разные органы и ткани и что до 16% вирусных ОРЗ связаны с вирусами герпеса как этиологическими факторами, применение Циклоферона в период подъема заболеваемости ОРВИ и гриппа способствует также и профилактике рецидивов ГИ [3].

Необходимо отметить, что во всех исследованиях с участием взрослых и детей переносимость Циклоферона была хорошей; выбывших пациентов в связи с побочными явлениями и индивидуальной непереносимостью не было.

Таким образом, на основании анализа данных литературы, а также результатов собственного исследования, можно сделать вывод о безопасности и высокой эффективности отечественного препарата Циклоферон и целесообразности его использования у больных как для терапии ГИ, так и для профилактики рецидивов ряда заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Leung D.T, Sacks S.L. Current recommendations for the treatment of genital herpes. *Drugs* 2000; 60: 6: 1329—1352.
2. Гомберг М. А., Соловьев А. М. Алгоритмы диагностики и лечения наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем. *Трудный пациент* 2004; 2: 5: 3—8.
3. Исаков В.А., Рыбалкин С.Б., Романцов М.Г. Герпесвирусная инфекция Рекомендации для врачей. СПб.: 2006; 96.
4. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусная инфекция человека. Руководство для врачей. СПб.: СпецЛит. 2006; 303.
5. Исаков В.А., Ермоленко Д.К., Исаков Д.В. Перспективы профилактики и лечения простого герпеса с монотонным типом рецидивирования. *Тер арх* 2011; 83; 11: 44—47.
6. Бажанова Е.Д. Циклоферон: механизм действия, функции и применение. *Эксп клин фармакол* 2012; 75: 7: 40—44.
7. Малащенко И.К., Дидковский Н.А., Левко А.А. К вопросу о роли индивидуального подбора иммунокорректоров. *Фарматека* 2004; 118—122.
8. Змушко Е.И., Митин Ю.А., Кацалуха В.В. и др. Цитокининдуцирующая и антивирусная активность Циклоферона на экспериментальной герпесвирусной инфекции. *Микробиол эпидемиол иммунобиол* 2003; 4: 105—107.
9. Сухинин В.П., Плесков В.М., Зарубаев В.В., Слита А.В. и др. Использование Циклоферона в терапии экспериментального герпетического кератита. *Антибиотики и химиотер* 2000; 45: 6: 13—16.
10. Каспаров А.А. Офтальмогерпес. М.: Медицина, 1994; 224.
11. Максимов И.Б., Голубев С.Ю., Коваленко А.Л. Эффективность циклоферона в лечении поверхностных форм герпетического кератита. *Медицинская Иммунология* 2004; 2: 46—54.
12. Хитрик Н.М., Малащенко И.К., Танасова А.Н. и соавт. Влияние интерферона-альфа и его индуктора на функциональную активность нейтрофилов при тяжелой герпетической инфекции. *Аллергология и иммунол* 2006; 7: 3: 397.
13. Василишина И. Ю. Оптимизация лечения генитального герпеса у женщин репродуктивного возраста :автореф. дис. к.м.н. М.: 2006; 26.
14. Сологуб Т.В., Романцов М.Г., Рыбалкина Т.С. и др. Модифицированная терапия герпесвирусной инфекции. *Клин мед* 2011; 89: 3: 54—57.
15. Шперлинг И.А., Венгеровский А.И., Шперлинг Н.В. Использование индукторов интерферона для фармакологической коррекции нарушений цитокинов у больных с рецидивирующим генитальным герпесом. *Эксп и клин фармакол* 2010; 73: 8: 39—42.
16. Сельков С.А., Коваленко А.Л. Эффективность таблетированной (кишечнорастворимой) формы циклоферона в терапии герпетической инфекции. *Леч врач* 2007; 5.
17. Линимент циклоферона (меглумина акридоната) в клинической практике: Клинические рекомендации для врачей. СПб.: 2007; 80.
18. Барер Г.М., Орехова Л.Ю., Безрукова И.В. и др. Линимент циклоферона в стоматологии. *Метод реком.* 2007.
19. Рахматуллина М.Р. Комбинированная терапия пациентов с рецидивирующей аногенитальной инфекцией. *Антибиотики и химиотер* 2011; 56: 11—12: 25—29.

20. *Хламова О.Г., Шульдяков А.А., Лепилин А.В.* Совершенствование терапии герпетического стоматита у пациентов с хроническим тонзиллитом. *Антибиотики и химиотер* 2011; 56: 7—8: 34—36.
21. *Соболева Л.А., Осеева А.О., Шульдяков А.А., Булкина Н.В.* Оптимизация терапии пародонтита у пациентов с ВИЧ-инфекцией. *Стоматология*. 2010; 89: 2: 26—28.
22. *Баранова И.П., Курмаева Д.Ю.* Сравнительный анализ эффективности антивирусной терапии у детей с инфекционным мононуклеозом. *Эксперим и клин фармакол* 2013; 76: 8: 47—49.
23. *Гордеев А.В., Савина О.Г., Бенева С.Н., Черникова А.А.* Инфекционный мононуклеоз: этиология, иммунологические варианты, методы коррекции. *Эксперим и клин фармакол* 2011; 74: 11: 29—32.
24. *Касымова Е.И., Башкина О.А., Галимзянов Х.М.* Клиническая эффективность циклоферона в комплексной терапии инфекционного мононуклеоза в педиатрии. *Антибиотики и химиотер* 2011; 56: 9—10: 37—40.
25. *Курмаева Д.Ю., Баранова И.П.* Терапевтическая эффективность различных лекарственных форм Циклоферона в лечении инфекционного мононуклеоза у детей. *Антибиотики и химиотер* 2011; 56: 9—10: 33—36.
26. *Романцов М.Г., Горячева Л.Г., Бехтерева М.К., Сологуб Т.В., Коваленко А.Л.* Эффективность Циклоферона при вирусных и бактериальных заболеваниях у детей (клинический обзор). *Антибиотики и химиотер* 2010; 55: 11—12: 39—51.

Гепатопротекторные эффекты экстрактов и полисахаридов морских водорослей

Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹, Т. А. КУЗНЕЦОВА¹,
С. П. КРЫЖАНОВСКИЙ², Н. Н. КОВАЛЕВ¹, Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА³

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» СО РАМН

² ФГБУЗ Медицинское объединение ДВО РАН

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

Hepatoprotective Effects of Extracts and Polysaccharides from Seaweed

N. N. BESEDNOVA, T. S. ZAPOROZHETS, T. A. KUZNETSOVA, S. P. KRYZHANOVSKII, N. N. KOVALEV, T. N. ZVYAGINTSEVA

G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok

Medical Association, Far East Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok

G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch of Russian Academy of Science, Vladivostok

На основании анализа большого количества работ отечественных и преимущественно зарубежных авторов последнего десятилетия представлены современные данные о действии экстрактов морских водорослей и полученных из них сульфатированных полисахаридов *in vivo* и *in vitro* при интоксикациях печени, вызванных CCl_4 , лекарственными препаратами (парацетамол, диклофенак), N-нитрозосоединениями (загрязнителями внешней среды), афлатоксином. Особое внимание авторы уделяют эффектам сульфатированных полисахаридов, в частности фукоиданов, при хроническом вирусном гепатите С. Фукоидан обладает высоким уровнем безопасности и действует не только как антиоксидант, но также оказывает противовоспалительный и иммуномодулирующий эффекты, ингибирует репликацию вируса гепатита. Сведения, изложенные в обзоре, позволяют считать, что экстракты морских водорослей и полученные из них сульфатированные полисахариды могут быть основой для создания в дальнейшем лекарственных препаратов нового поколения для лечения и профилактики болезней печени различного генеза.

Ключевые слова: гепатопротекторы, антиоксиданты, полисахариды морских водорослей, фукоиданы.

Antioxidants of natural origin are considered as possible agents for prevention and treatment of liver diseases. Marine algae and in particular their extracts and obtained from them sulfated polysaccharides are significant sources of natural antioxidants. The recent data on the effect of the extracts and sulfated polysaccharides of seaweed on the functional activity of the liver with injuries induced by CCl_4 , some drugs (paracetamol, diclofenac), N-nitrosocompounds, aflatoxin are presented in the review. Particular attention is paid to the effect of sulfated polysaccharides and in particular fucoidans on the functional activity of the liver in patients with chronic viral hepatitis C. Fucoidan is highly safe and active not only as an antioxidant but also as an inhibitor of HCV replication, has anti-inflammatory and immunomodulating effects. The data of the review allow to conclude that seaweed extracts and sulfated polysaccharides may be a basis for development of new generation drugs in the future for the treatment and prevention of liver diseases.

Key words: hepatoprotectors, antioxidants, polysaccharides from seaweed, fucoidans.

Изменение стиля жизни и питания современного человека привело к широкому распространению заболеваний печени и высокой смертности от этой патологии во всех странах. Печень участвует практически во всех видах обмена — белковом, липидном, углеводном, водно-минеральном, пигментном — и является основным органом детоксикации, в связи с чем в большей степени, чем другие органы подвержена действию экзогенных токсикантов. Токсические поражения печени вызываются различными токсикантами — продуктами бытовой химии, пестицидами,

алкоголем, лекарственными препаратами, вредными отходами хозяйственной деятельности человека, вирусами и бактериями, природными ядами (афлатоксин, яд рыбы фугу и пр.).

Хронические заболевания печени, в том числе и вирусные гепатиты, характеризуются прогрессирующим развитием изменений от стеатоза до хронического гепатита, фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. Анализ современной литературы позволяет утверждать, что усилия многочисленных групп исследователей в разных странах в настоящее время сосредоточены на изучении полисахаридов и экстрактов водорослей как источников природных антиоксидантов и возможности использования их в качестве гепатопротекторов. Необходимость этих исследова-

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1. ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» СО РАМН

ний определяется следующими факторами. Во-первых, иммуномодулирующий [1, 2], гиполлипидемический [3], сорбирующий [4] и позитивно влияющий на функционирование желудочно-кишечного тракта эффекты водорослей и получаемых из них полисахаридов непосредственно связаны с печенью, играющей центральную роль в метаболических процессах организма. Во-вторых, известны работы о гипогликемическом [5], антиоксидантном [6], детоксикационном [2, 7] действии сульфатированных полисахаридов (СПС), в реализации которого участвуют ферменты и метаболиты, синтезируемые печенью.

В патогенезе интоксикаций печени различного генеза доминирующее значение имеет оксидативный стресс, который характеризуется нарушением обмена веществ и энергии, накоплением активных повреждающих агентов (свободных радикалов, прооксидантов, активных форм кислорода), инициирующих патологические изменения клеток и ведущих к развитию различных патологических состояний [8]. Основным повреждающим эффектом свободных радикалов заключается в повреждении мембран клеток, модификации белков РНК и ДНК.

В качестве медикаментозной терапии на всех этапах и при всех формах токсического поражения печени применяются антиоксиданты, которые в настоящее время рассматриваются как возможные средства профилактики болезней печени.

Богатыми природными источниками веществ, обладающих антиоксидантным действием, являются водоросли — макро- и микровиты [9, 10]. В экстрактах этих гидробионтов обнаружены компоненты, многие из которых обладают антиоксидантной активностью: полифенолы, ксантофиллы, водорастворимые полисахариды, аминокислоты и витамины [11]. В связи с этим очень часто исследования антиоксидантной активности проводят, используя суммарные экстракты. В последние годы убедительно показано, что СПС водорослей, особенно бурых, играют важную роль в предупреждении развития окислительного стресса живых организмов [12, 13] благодаря способности перехватывать супероксидные радикалы, а также ингибировать взаимодействие между металлами и липидами через образование нерастворимых комплексов с ионами железа и/или генерацией стерических препятствий. Так, некоторые гетерофуканы обладают дозозависимой хелатирующей способностью, которая может составлять до 45,5% при дозе 1,5 мг/мл для водоросли *Dyctiopteris delicatula* и 54,8% для *Sargassum filipendula* при концентрации 2,0 мг/мл [13]. Антиоксидантная активность СПС связана не только с молекулярной массой и с наличием сульфатных групп, но и с содержанием глюкуроновой кислоты, фукозы и нейтральных сахаров [14]. Сульфа-

тированные и фосфорилированные глюканы имеют большую антиоксидантную активность, чем нейтральные полисахариды.

Известно, что в составе водорослей фукоидан находится в тесной связи с полифенолами, обладающими собственной высокой антиоксидантной активностью. Такие комплексы очень прочны и при выделении фукоиданов могут сохранять полифенолы в своем составе. Скорее всего, в большинстве случаев антиоксидантная активность препаратов фукоиданов обусловлена присутствием в них этих соединений [14].

Особый интерес в качестве антиоксидантов представляют фукоиданы, полученные из *Laminaria japonica* [15], *Fucus vesiculosus* [16] и *Fucus evanescens* [5, 17].

На модели алиментарной гиперхолестеринемии было оценено влияние фукоидана из *F. evanescens* в дозе 50 мг/кг массы тела экспериментальных животных на показатели перекисного окисления липидов [5]. Авторы показали, что фукоидан в условиях атерогенной нагрузки способен снижать уровень промежуточных продуктов перекисного окисления липидов. У мышей, содержащихся на атерогенной диете, статистически значимо увеличивалось содержание малонового альдегида в эритроцитах по сравнению с показателями интактных животных.

Для каррагинанов — СПС красных водорослей — *in vitro* показана железо-редуцирующая способность и ингибирующее действие на гидроксил- и супероксиданион радикалы. Каррагинаны усиливают каталитическую активность супероксиддисмутазы. Степень активности каррагинанов зависит от их молекулярной массы и структуры [18].

Для исследования эффективности гепатопротекторов, в том числе экстрактов и полисахаридов морских водорослей, используют различные модели. Наиболее часто токсическое поражение печени воспроизводят введением животным четыреххлористого углерода — CCl_4 . Под действием этого токсиканта наблюдаются метаболические и морфологические изменения в печени, сходные с таковыми при вирусном гепатите человека [19]. Четыреххлористый углерод биотрансформируется в печени в трихлорметилрадикалы, которые реагируют с избытком O_2 (CCl_3^+). Свободные радикалы инициируют перекисную полиненасыщенных жирных кислот мембран и ковалентно связывают микросомальные липиды, протеины и пероксиды протеинов и липидов, что приводит к нарушениям со стороны клеток и патологическим изменениям в печени [20].

Под действием CCl_4 происходит нарушение антиоксидантной системы организма, уменьшение внутриклеточной концентрации глутатиона (GSH), снижение активности каталазы, что может служить в конечном итоге причиной развития кар-

циногенеза [21]. В результате усиления перекисного окисления липидных комплексов внутриклеточных мембран гепатоцитов нарушается активность ферментов и ряда функций печени (синтез белков, углеводов, обмен липопротеидов, метаболизм лекарств) [22, 23]. Под влиянием CCl_4 повышается содержание основных ферментов печени, глюкозы и билирубина. Длительное введение этого токсиканта в желудок животного ведёт к развитию цирротических изменений в печени [24].

Применение этой модели позволило как отечественным, так и зарубежным авторам исследовать гепатопротекторное действие экстрактов и полисахаридов морских водорослей.

Так, F. Fedekar et al. [20] исследовали гепатопротекторное действие этанольного экстракта водоросли *Sargassum dentifolium* при интоксикации крыс, вызванной CCl_4 , в сравнении с таким силимарином, официального препарата — гепатопротектора из расторопши.

У животных, получивших только CCl_4 , наблюдались типичные явления токсического гепатита: диффузные дегенеративные изменения гепатоцитов, их жировая дегенерация; обширные зоны некроза и внутридолевого фиброза; значительная инфильтрация ткани печени мононуклеарными клетками (преимущественно лимфоцитами); гиперплазия жёлчных протоков. Авторы определяют эти изменения, как 3—4 степень фиброза.

У крыс, получавших наряду с токсикантом экстракт водоросли, наблюдали изменения, характерные для фиброза 1-й степени: слабую пролиферацию фиброзной ткани вокруг портальной области; небольшую инфильтрацию ткани (преимущественно лимфоцитами); незначительный фиброз с перипортальным и небольшим внутридовым фиброзом перегородок. У животных, получивших силимарин, определялась 1—2 степень фиброза: имела место умеренная инфильтрация лимфоцитами, в меньшей степени — макрофагами. Силимарин вызывал, кроме того, переполнение кровью портальных сосудов и синусоидов печени, умеренную дегенерацию гепатоцитов, пролиферацию фиброзной ткани вокруг портальных трактов.

Ферменты сыворотки крови — АЛТ (аланинаминотрансфераза) и АСТ (аспартатаминотрансфераза) являются чувствительными маркерами повреждения печени [20]. При повреждении печени CCl_4 отмечается повышенный уровень АСТ, более значительный, чем АЛТ.

Повышение в сыворотке крови уровня АЛТ и билирубина, как правило, свидетельствует о нарушениях со стороны гепатобилиарной системы, а сниженный уровень альбумина наблюдается наиболее часто при обострениях хронических болезней печени. S. P. Pattanyak и S. Priyashree [25] объясняют это снижение повреждением эндоплазматического ретикула, в результате чего

снижается синтез белка и происходит накопление триглицеридов в жировой ткани печени.

Результаты исследования F. Fedekar et al. [20] показали, что применение экстракта водоросли при токсическом гепатите, вызванном CCl_4 , значительно снижало содержание в сыворотке крови АСТ, АЛТ и билирубина до нормальных значений. Кроме того, экстракт минимизировал продукцию свободных радикалов и усиливал очищение от них организма. Наблюдавшееся этими авторами повышение уровня альбумина в сыворотке крови под действием экстракта свидетельствует о стабилизации эндоплазматического ретикула и инициации синтеза белка. По всем биохимическим параметрам действие экстракта водоросли *Sargassum dentifolium* и силимарина было сопоставимо. По мнению авторов, использование данной водоросли приводит к нормализации всех оценочных параметров у крыс, получивших токсикант.

R. Karthikeyan et al. [26] исследовали защитное действие экстракта бурой водоросли *Padina boergeresii* у крыс с токсическим гепатитом. Эффект экстракта (нормализация показателей функциональной активности печени), как и другие исследователи, авторы связывают с антиоксидантным действием последнего, но обращают внимание на тот факт, что нормализация повышенных показателей коррелирует с присутствием в экстракте каротиноидов, также обладающих антиоксидантными свойствами [14].

Фиброз печени — заболевание, характеризующееся разрастанием соединительной (коллагеновой волокнистой) ткани в печени без изменения её структуры. Причинами развития фиброза могут быть гепатиты В и С, алкогольная интоксикация, неалкогольный стеатогепатит и пр. На земном шаре в настоящее время проживают свыше 100 млн человек с фиброзом печени [27].

На модели токсического гепатита, обусловленного CCl_4 (при остром и хроническом повреждении печени), исследован эффект общей фракции фукоидана в качестве средства против фиброза печени у крыс [27]. При внутривенном введении в течение 8 недель в дозе 50 мг/кг полисахарид значительно снижает степень фиброза, защищает гепатоциты и подавляет пролиферацию звездчатых клеток, возвращает АЛТ и АСТ к уровню контроля.

Антифибротическое действие фукоидана связано с индукцией апоптоза звездчатых клеток [28], а также его ингибированием уровня $\text{TGF}\beta$, активирующего звездчатые клетки.

Т. А. Кузнецова и др. [7] моделировали токсический гепатит введением мышам CCl_4 . Использовали лечебную (30 дней на фоне индукции гепатита) и профилактическую схемы введения фукоидана из водоросли *F. evanescens* (ежедневно

в течение 30 дней до момента индукции гепатита). Результаты исследования показали, что под действием CCl_4 масса печени мышей достоверно увеличивалась по сравнению с контролем. Применение магнитно-резонансной томографии мышей выявило увеличение обеих долей печени, стромы и паренхимы были резко деформированы, в них преобладали воспалительные изменения, отмечалось венозное полнокровие. На фоне применения фукоидана отмечена нормализация линейных размеров печени, частичное восстановление структуры печени, более выраженные при профилактической схеме введения полисахарида. В биохимической картине крови у животных, получавших фукоидан по обеим схемам, наблюдалась нормализация показателей аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы и значительное снижение уровня глюкозы. Учитывая полученные результаты, авторы рекомендуют фукоидан, полученный из бурой водоросли *F. evanescens*, в качестве гепатопротектора.

На такой же модели токсического гепатита G. Buresh et al. [29] были получены данные о значительной роли антиоксидантной активности фукоидана в механизме его гепатопротекторного действия.

Неконтролируемое использование ряда лекарственных препаратов приводит к нарушению функций печени, а также морфологическим изменениям этого органа. К таким лекарственным средствам относятся, в частности, парацетамол и диклофенак.

Гепатотоксичность ацетаминофена или парацетамола зависит от интенсификации процессов свободнорадикального окисления с последующим повреждением мембранных структур гепатоцитов. При поступлении в организм парацетамола в токсической дозе функция систем конъюгации оказывается недостаточной, запасы глутатиона в печени истощаются, поэтому значительная часть молекул преобразуется в токсические вещества, наиболее активным из которых является N-ацетил-p-бензохинонимин [30]. Последний ковалентно связывается с белками гепатоцитов и вызывает их некроз.

H.R.V. Radhavendran et al. [31] использовали модель острого гепатита, вызванного ацетаминофеном, для исследования гепатопротекторного действия этанольного экстракта водоросли *Sargassum polycystum*. Токсикант вводили крысам в дозе 800 мг/кг, индуцирующей оксидативный стресс у животных. Другой группе крыс ежедневно в течение 15 дней до введения парацетамола давали перорально экстракт водоросли в дозе 200 мг/кг.

У животных, получавших только ацетаминофен, возникало тяжелое расстройство метаболической функции печени. В сыворотке крови животных наблюдался высокий подъем уровня АЛТ,

АСТ, щелочной фосфатазы, малонового диальдегида, свободных радикалов. Введение экстракта водоросли возвращало показатели к нормальным значениям. V. Ross et al. [32] исследовали водный экстракт сульфатированных полисахаридов из водоросли *Sargassum siliculosum* на модели токсического гепатита крыс, вызванного ацетаминофеном. Пероральное использование токсиканта в дозе 2 г/кг приводило к значимому подъему уровня трансаминаз в плазме крови. Пероральное применение СПС в дозе 100 мг/кг и 200 мг/кг в день в течение 7 дней приводило к снижению уровня этих ферментов. Величина снижения была сопоставима с таковой при использовании референс-препарата — силимарина.

При тяжелом оксидативном стрессе врожденная антиоксидантная защита не может справиться с огромным количеством образующихся радикалов. В таких случаях антиоксиданты, в частности экстракты или полисахариды водорослей, необходимо вводить извне для соблюдения баланса реактивных видов кислорода [12, 33]. По мнению авторов, активность экстракта в отношении удаления реактивных видов кислорода может быть обусловлена наличием сульфатной группы, моносахаридным составом, молекулярной массой и содержанием белка [12, 34]

Другие авторы [35] показали протективный эффект фукоидана при остром повреждении печени крыс ацетаминофеном (800 мг/кг внутрибрюшинно). Фукоидан в дозе 100 мг/кг применяли перорально до и после введения ацетаминофена. Уже через сутки после совместного введения токсиканта и фукоидана уменьшалась гибель гепатоцитов. Фукоидан снижал развитие апоптоза в печени, индуцированного ацетаминофеном, что было доказано экспрессией Bax, Bcl-2 и расщеплением каспазы-3. Антиоксидантный эффект фукоидана проявлялся повышением продукции и экспрессии глутатиона, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, которые были значительно снижены под действием парацетамола. Фукоидан снижал экспрессию провоспалительных медиаторов, включая $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ и индуцибельную NO-синтазу. Таким образом, гепатопротекторный эффект препаратов из водорослей при введении животным парацетамола обеспечивается их антиоксидантным и противовоспалительным потенциалом.

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), в том числе диклофенак, являются одной из наиболее востребованных групп лекарственных средств. Наряду с их многочисленными положительными эффектами, они обладают побочными действиями — НПВП-ассоциированными поражениями печени, особенно у тех пациентов, которые постоянно их используют для избавления от болей в суставах, позвоночнике и пр. Пероральные НПВП более агрессивны по от-

ношению к печени, поскольку она является первым детоксицирующим барьером для продуктов, поступающих из кишечника. В связи с этим авторы многих работ используют диклофенак в качестве токсиканта для проведения экспериментов на животных с целью поиска гепатопротекторов среди препаратов из морских гидробионтов.

А. Е. El-Naggar and H. S. Hussein [36] показали протективный эффект фукоидана против поражения печени, вызванного диклофенаком, вызывающим в больших дозах дисфункцию митохондрий гепатоцитов, пероксидацию липидов, увеличение концентрации кальция в печени, образование активных форм кислорода и окисление NADPH, некроз и/или апоптоз гепатоцитов [37–39]. Фукоидан снижает экспрессию на клетках TLR4 и уровень провоспалительных цитокинов. Авторы рекомендуют пероральное применение фукоидана против побочного действия диклофенака и других НПВП.

В последние десятилетия увеличивается загрязнение окружающей среды вследствие интенсивной хозяйственной деятельности человека. К загрязнителям природной среды относится большая группа N-нитрозосоединений. Высокой токсичностью по отношению к печени и почкам и способностью вызывать фиброз печени обладает N-нитрозамин. В работе К. Nakazato et al. [40] при помощи N-нитрозодиэтиламина (DEN) вызывали фиброз печени у крыс. Токсикант вводили в дозе 50 мг/кг. Для уменьшения степени фиброзирования печени был применен высокомолекулярный фукоидан из бурой водоросли *Cladosiphon okamuranus*. В процессе работы было установлено, что фиброз печени у крыс, получивших кроме DEN, неочищенный фукоидан, был значительно менее выражен, как и уровень гидроксипролина — аминокислоты, специфического маркера коллагеновых белков. Авторы характеризуют фукоидан как перспективное антицирротическое средство.

D-галактозамин является опасным гепатотоксином, нарушающим синтез нуклеиновых кислот и белка. При интоксикации данным токсином на фоне массивного некроза гепатоцитов замедляется регенерация печени. Поражение печени этим токсикантом рассматривают как адекватную модель структурно-метаболических нарушений при вирусном гепатите.

Использование такой модели позволило N. Kawano et al. [41] исследовать эффективность экстрактов 11 видов водорослей (бурых и красных) в качестве гепатопротекторов у крыс, получивших D-галактозамин (800 мг/кг массы тела внутрибрюшинно на 7 день после начала введения экстрактов). Эксперименты позволили установить, что экстракты водорослей могут предотвращать токсические изменения в печени животных, обусловленные этим токсикантом.

На такой же модели В. Meena et al. [42] установили антиоксидантное действие этанолового экстракта водоросли *Sargassum polycistum*. В индийской медицине эта водоросль широко применяется при вирусном гепатите и характеризуется наиболее выраженным по сравнению с другими водорослями антиоксидантным действием. Авторы полагают, что большую роль в антиоксидантном действии экстракта играет сульфатный компонент, являющийся ловушкой для свободных радикалов. В работе [43] представлены результаты исследования эффективности экстракта водоросли *Sargassum polycistum* при введении крысам N-галактозамина. У животных с токсическим гепатитом, получавших экстракт, повышался уровень глутатиона, супероксиддисмутазы и каталазы.

N. Manoharan et al. [44] исследовали гепатопротекторное действие водного экстракта красной водоросли *Gracillaria corticata*, собранной в Индии, у крыс Wistar, которые для индукции гепатотоксического эффекта получали афлатоксин B1, продукт грибов *Aspergillus*, часто засоряющий продукты питания человека и корма для животных. Этот токсикант обладает мощным гепатотоксическим действием, вызывает перекисное окисление липидов в печени, снижение массы тела и печени, количество общего белка и альбумина в сыворотке крови [45]. Применение экстракта водоросли у крыс с токсическим гепатитом возвращало к норме высокие показатели трансаминаз в сыворотке крови. Показатели снижения гиперферментемии были близкими при лечебном и профилактическом вариантах введения экстракта. Почти до нормальных значений снижались показатели лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы. Снижение уровня билирубина под действием экстракта были сравнимы с таковыми силимарина. Уровни белка и альбумина под действием экстракта восстанавливались почти до нормальных значений.

Установлено, что фукоидан, полученный из бурой водоросли *Fucus vesiculosus* (Sigma), защищает экспериментальных животных (мышей) от индуцированного конканавалином А повреждения печени [46]. Отмечено, что алкогольное [47] и вирусное [48] повреждения печени имеют сходную картину с Кон-А индуцированным гепатитом и связано с активацией Т-лимфоцитов. При введении Кон-А в дозе 10 мг/кг развивается острый некротический гепатит с обширными некрозами и увеличением некротических зон на 1–3 сутки. А. Saito et al. [46] вводили внутривенно Кон-А в дозе 18,5 мг/кг массы тела мыши. Различные дозы фукоидана (1–30 мг/кг) вводили внутривенно за 30 минут до инъекции Кон-А. Авторы отметили снижение под действием фукоидана АЛТ в плазме крови, уровня TNF α и IFN γ и

увеличение уровня IL-10 в плазме крови и ткани печени. Эти результаты свидетельствуют о защитном эффекте фукоидана путём ингибирования про- и повышения уровня противовоспалительных цитокинов.

В настоящее время чрезвычайно важной проблемой, стоящей перед учеными, является поиск средств профилактики и лечения вирусных гепатитов.

По данным ВОЗ, в мире насчитывается более 150 млн больных хроническим вирусным гепатитом С, ежегодно более 350000 человек умирают от этой болезни. Ежегодно диагностируется примерно 3,5 млн новых случаев этой болезни [49, 50]. В России больных хроническими формами и носителей HCV не менее 2 млн человек. Из-за значительной изменчивости возбудителя ещё не разработана вакцина против гепатита С. Для лечения пациентов используют комбинированный метод лечения — пегилированный IFN α и рибавирин. Сообщают, что эффективность эрадикации при этом составляет 75—90% для генотипов II и III и 45—52% — для генотипов I и IV [51]. Однако ситуация ещё очень далека от желаемой. Данный метод лечения имеет много побочных эффектов. В связи с этим поиск новых эффективных средств для борьбы с этой болезнью весьма актуален. Следует отметить, что исследования, касающиеся применения экстрактов водорослей и СПС из них, весьма немногочисленны.

Известно противовирусное действие СПС водорослей. Фукоидан, например, ингибирует адсорбцию к клеткам вирусов герпеса, Денге, гриппа, клещевого энцефалита, хантавирусов и др. [52—54].

В экспериментах *in vitro* P. S. Venkateswaran et al. [55] показали, что фукоидан из водоросли *Pelvetia fastigiata* ингибирует взаимодействие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к нему, что является важным в предупреждении поражений инфицированных тканей и органов. Большинство исследователей объясняют противовирусный эффект фукоиданов подавлением адсорбции вирусов на клетках макроорганизма.

В работе N. Mori et al. [56] авторы использовали в экспериментах *in vitro* фукоидан из бурой водоросли *Cladosiphon okamuranus*. Было показано, что фукоидан ингибирует репликацию HCV, не оказывая цитотоксического действия. В 2013 году появилась еще одна работа [57], в которой авторы рассматривают возможность ингибирования репликации вируса гепатита С в клетках Huh-7 с помощью водного экстракта красной водоросли *G.tenuistipitata*. Было установлено, что экстракт оказывает мощное тормозящее действие на синтез белка HCV с дозозависимым эффектом. Еще более значительный эффект полу-

чен при комбинации экстракта с интерфероном. Установлен ингибирующий эффект экстракта на продукцию провоспалительных медиаторов, включая TNF α , IL-1 β , индуцибельную NO-синтазу (iNOS) и COX-2. Авторы подчеркивают, что в связи с многокомпонентностью экстракта пока ещё трудно установить точный механизм подавления репликации HCV и именно на выделение активных компонентов экстрактов необходимо обратить особое внимание.

В литературе есть лишь единичные работы, освещающие действие фукоиданов на течение хронического гепатита С. Так, в работе Н. В. Филоновой [17] представлены результаты использования БАД «Фуколам» (на основе фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и альгината кальция) в качестве средства сопровождения базисной терапии пациентов с хроническим гепатитом С. В опытную группу были включены пациенты с обострением гепатита С, которые в комплексе с базисной терапией получали БАД «Фуколам» внутрь два раза в сутки в течение 21 дня. Контрольную группу составили пациенты, получавшие базисное лечение, включающее охранительный режим, лечебное питание, дезинтоксикационную и метаболическую терапию.

Под влиянием проведённой терапии у пациентов контрольной и опытной групп наблюдалось снижение активности аминотрансфераз в сыворотке крови, однако уровень этих показателей у пациентов, получавших в комплексе с базисной терапией «Фуколам», был значимо ниже, чем в контрольной группе. Наблюдалась положительная динамика и в их состоянии. На фоне приёма «Фуколама» у пациентов опытной группы быстрее купировались симптомы заболевания по сравнению с пациентами контрольной группы. К моменту окончания лечения у 70,3% пациентов опытной группы размеры печени уменьшились, у 29,6% больных достигли нормальных размеров. У пациентов контрольной группы нормализации размеров печени достигнуть не удалось, лишь у 16,6% больных они уменьшились.

В этой же работе исследовано действие полисахаридов бурой водоросли *F. evanescens* на систему ПОЛ-АОС у пациентов с обострением хронического гепатита С. Как известно, смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону активации процессов ПОЛ при HCV-инфекции приводит к развитию синдрома липидной перекисидации, связанного с накоплением АФК и липидных радикалов, участвующих в повреждении биомембран гепатоцитов. Полагают, что эти процессы лежат в основе синдрома цитолиза у пациентов с вирусным гепатитом С [58—60].

Нормализация показателей системы ПОЛ-АОС у пациентов с ХВГС, получавших «Фуколам», свидетельствует о его способности оказы-

вать регулирующее действие на процессы липопероксидации — восстанавливать баланс между процессами перекисного окисления липидов и механизмами антиоксидантной защиты.

В 2012 году появилась работа [56], в которой авторы показали способность фукоидана из бурой водоросли *Cladosiphon ocamuranus* оказывать действие на вирус гепатита *in vivo*. В опытную группу были взяты лица, которые по каким-либо причинам не могли получать лечение интерфероном. У всех пациентов определялся Ib генотип вируса. В течение 12 месяцев они получали фукоидан (830 мг/сут). У всех больных был диагностирован цирроз печени. Через 9 месяцев у 40% пациентов произошла эрадикация вируса, хотя RNA HCV определялась (5 kIU/мл) еще до 10 месяцев. Однако этот эффект был временным. Через 12 месяцев показатель вирусной нагрузки вернулся к базовым значениям. Авторы частично объясняют это не совсем правильным подбором пациентов опытной группы. По-видимому, фукоидан таким больным следует принимать постоянно, тем более что он не токсичен и не обладает какими-либо другими неблагоприятными побочными эффектами

Заключая обзор о действии экстрактов водорослей и полисахаридов, полученных из их экстрактов, в качестве гепатопротекторов, следует признать, что в настоящее время необходимо обратить особое внимание на расширение ис-

следований в этой области, поскольку на основе таких соединений, как фукоиданы, могут быть созданы препараты нового поколения для профилактики и лечения гепатита С и токсических гепатитов. Это обусловлено многогранностью действия сульфатированных полисахаридов — антивирусное (ингибирование адсорбции и репликации вирусов), гепатопротекторное, антиоксидантное, иммуномодулирующее, противовоспалительное, антиопухолевое и др. Поскольку одним из требований к гепатопротекторам является безопасность, остается актуальной потребность в препаратах, обладающих эффективными фармакологическими свойствами, низкой токсичностью и минимальным побочным действием. Фукоиданы в этом отношении обладают высоким профилем безопасности. В дальнейшем, когда будет возможно получение стабильных форм водорослевых полисахаридов, могут быть разработаны эффективные лекарственные формы на их основе. Эти новые гепатопротекторы будут способны оказывать выраженное антиоксидантное действие, обеспечивающее подавление оксидативного стресса в организме и клетках печени, прекращение цитолиза гепатоцитов, нормализацию ферментного спектра и липидного профиля сывороток крови, восстановление белоксинтезирующей функции печени, усиление иммунной защиты организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запорожец Т.С., Кузнецова Т.А., Смолина Т.П. и др. Иммунотропные и антикоагулянтные свойства фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*: перспективы применения в медицине. Журн микробиол 2006; 3: 54—58.
2. Кузнецова Т.А. Применение фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* для коррекции нарушений иммунитета и гемостаза на модели эндотоксемии. Бюлл эксп биол мед 2009; 147 (1): 71—74.
3. Huang L., Wen K., Gao X., Liu Y. Hypolipidemic effect of fucoidan from *Laminaria japonica* in hyperlipidemic rats. Pharmaceutical Biology 2010; 48:4: 422—426.
4. Хотимченко М.Ю. Сорбционные свойства и фармакологическая активность некрахмальных полисахаридов. Дис. ... докт. биол. наук. Владивосток. 2011; 327.
5. Майстровский К.В., Запорожец Т.С., Федянина Л.Н., Каленик Т.К., Моткина Е.В., Имбе Т.И. Влияние иммуномодулятора фукоидана из бурых водорослей *Fucus evanescens* на показатели антиоксидантной системы, липидного и углеводного обмена у мышей. Тихоокеан мед журн 2009; 3: 97—99.
6. Bartolomeu W.S.S., Miguel A.C., Ana I.B., Ana C.P., Joana T.M., Jose A.T., Manuel A.C., Antonio A.V. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracillaria birdiae*. Food Hydrocolloid 2012; 27: 287—292.
7. Кузнецова Т.А., Агафонова И.Г., Крохмаль Т.С., Звягинцева Т.Н., Филонова Н.В. Гепатопротекторные свойства фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*. Тихоокеан мед журн 2010; 4: 26—29.
8. Paracha U.Z., Fatima K., Alquhtani M., Chaudhary A., Abuzenadah A., Damanhour G., Qadri I. Oxidative stress and hepatitis C virus. Virology Journal 2013; 10: 251—258.
9. Abd El Baky H.H., El-Baroty G.S. Healthy benefit of microalgal bioactive substances. J Aquatic Sci 2013; 1: 1: 11—23.
10. Munir N., Sharif N., Naz S., Manzoor F. Algae: a potent antioxidant source. Sky J Microbiol Res 2013; 1: 3: 22—31.

11. Zakaria A.N., Ibrahim D., Sulaiman S.F., Supardy N.A. Assessment of antioxidant activity, total phenolic content and *in vitro* toxicity of Malaysian red seaweed *Acanthophora specifera*. Chem Pharm Res 2011; 3: 182—191.
12. Costa L.S., Fidelis G.P., Cordeiro S.L., Oliveira R.M., Sabhy D.A., Camara R.B.G., Nobre L.T.D., Costa M.S.S.P., Almedia-Lima J., Farias E.H.C., Leite E.L., Rocha H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. Biomed Pharmacother 2010; 6: 21—28.
13. Costa L.S., Telles C.B.S., Oliveira R.M. Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells. Mar Drugs 2011; 9: 4: 603—614.
14. Chojnacka K., Saeid A., Witkowska Z., Tuhy L. Biologically active compound in seaweed extracts — the prospects for the application. The Open Conf Proceed J 2012; 3: Suppl 1-M4: 20—28.
15. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Song H., Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. Int J Biol Macromol 2010; 46: 6—12.
16. Ruperez P., Ahrasem O., Leal J.A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. J Agric Food Chem 2002; 50: 840—845.
17. Филонова Н.В. Коррекция функций иммунной системы сульфатированными полисахаридами водорослей у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. Дис. ... канд. мед. наук. Владивосток. 2011; 151.
18. Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф., Соколова Е.В., Богданович Р.Н., Ермак И.М., Барабанова А.О. Изучение *in vitro* и *ex vivo* антиоксидантной активности каррагинанов — сульфатированных полисахаридов красных водорослей. Бюлл эксп биол мед 2010; 10: 398—401.
19. Johnston D.E., Kroening C. Mechanism of early carbon tetrachloride toxicity in cultured rat hepatocytes. Pharmacol Toxicol 1998; 83: 231—239.
20. Fedekar F., Madkour D., Waleed F. Khalil, Dessouki A.A. Protective effect of ethanol extract of *Sargassum dentifolium* in carbon tetrachloride-induced hepatitis in rats. Int J Pharmac Pharmacut Sci 2012; 4: 3: 637—641.

21. Stal P., Olson J. Ubiquinone: oxidative stress and liver cancerogenesis. In: Kagan Ve, Quinn D.J., editors. Coenzyme Q: molecular mechanisms in health and disease. Boca Raton: CRC Press 2000; 317—329.
22. Саратиков А.С., Буркова В.Н., Венгеровский А.И., Кураколова Е.А. Новые гепатопротективные и противовоспалительные препараты пелоидов. Томск: ТГУ. 2004; 178.
23. Zhu W., Fung P.G.V. The roles played by crucial free radicals, nitric oxide and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury of mice. Free Rad. Biol Med 2000; 29: 9:870—880.
24. Подымова С.Д. Болезни печени: руководство для врачей. М.: Медицина. 2005; 768.
25. Pattanyak S.P., Priyashree S. Hepatoprotective activity of the leaf extracts from *Dendrophthoe falcate* (L.f.) Ettingsh against carbon tetrachloride-induced toxicity in wistar albino rats. Parmacog Mag 2008; 4: 218—222.
26. Karthikeyan R., Somasundaran S.T., Manivasagam T., Balasubramanian T., Anantharaman P. Hepatoprotective activity of brown alga *Padina boergeresii* against CCl₄-induced oxidative damage in wistar rats. Asian Pacific J. Trop Med 2010; 26: 696—701.
27. Hayashi S., Itoh A., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Yagi K. Fucoidan partly prevents CCl₄-induced liver fibrosis. Eur Pharmacol 2008; 580: 3: 380—384.
28. Hayashi S., Itoh K., Isoda M., Kondoh M. Fucoidan partly prevents CCl₄-induced liver fibrosis. Int J Biol Macromolec 2009; 44: 170—174.
29. Bupesh G., Amutha C., Vasanth S., Manoharan N., Raja R.S., Krishnamoorthy R., Subramanian P. Hepatoprotective efficacy of *Hypnea muciformis* ethanolic extract on CCl₄-induced toxicity in rats. Braz ArchBiolTechnol 2012; 55: 6: 857—863.
30. Соколовская А.Н. Влияние лохейна на метаболизм печени при острой интоксикации, вызванной парацетамолом и D-галактозаминном. Бюлл эксп биол мед 2006; 3: 48—52.
31. Radhavendran H.R.B., Sathivel A., Devaki T. Hepatoprotective nature of seaweed alcoholic extract on acetaminophen-induced hepatic oxidative stress. J Health Science 2004; 50: 1: 42—46.
32. Ross V., Joven A., Donnie R.J., Morales M., Padiernos K., Pangilinan K., Charm P., Princesa J. Hepatoprotective effects of aqueous sulfated polysaccharide extract from *Sargassum siliquosum* J.G. Agardh on paracetamol-induced oxidative liver toxicity and antioxidant properties. Int J Pharmaceutic Frontier Res 2012; 2: 1: 15—27.
33. Wijesekara I., Pangestuti R., Se-Kwon K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydr Polym 2010; 84: 14—21.
34. Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity. Molecules 2008; 13: 1671—1695.
35. Hong S.W., Lee H.S., Jung K.H. Protective effect of fucoidan against acetaminophen-induced liver injury. Arch Pharm Res 2012; 35: 6: 1099—10105.
36. El-Naggar A.E., Hussein H.S. Protective and therapeutic effects of fucoidan, brown algae extract, against diclofenac sodium hepatonephro toxicity in rat. Egypt J Comp Path Clin Path 2010; 23: 1: 154—173.
37. Galati G., Tafazoli S., Sabzevari O., Chan T., O'Brien P.J. Idiosyncratic NSAID drug-induced oxidative stress. Chem Biol Interac 2002; 142: 25—41.
38. O'Connor N., Dargan P.I., Jones A.L. Hepatocellular damage from non-steroidal antiinflammatory drugs. J Med 2003; 96: 787—791.
39. Boelsterli U. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. Toxicol App Pharmacol 2003; 192: 307—322.
40. Nakazato K., Takada H., Iha M., Nagamine T. Attenuation of N-nitrosodiethylamine-induced liver fibrosis by high-molecular-weight fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus*. J Gastroenterol Hepatol 2010; 25: 10: 1692—1701.
41. Kawano N., Egashira Y., Sanada H. Effects of various kinds of edible seaweeds in diets on the development of D-galactosamine-induced hepatopathy in rats. Nutr Sci Vitaminol 2007; 53: 4: 315—323.
42. Meena B., Ezhilan R.A., Rajesh R., Hussain A.S., Ganesan B., Anandan R. Antihepatotoxic potential of *Sargassum polycystum* (Phaeophyceae) on antioxidant defense status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. African J Biochem Res 2008; 2: 2: 51—55.
43. Ohta Y., Matsura T., Kitagawa A., Tokunaga K., Yamada K. Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species contribute to the development of D-galactosamine-induced liver injury in rats. Free Radic Res 2007; 41: 135—144.
44. Manoharan N., Sampathkumar P., Dheeba B., Sheikabdulla S., Vinothprasanna G., Vinnothkannan R., Kalavathy S., Vijayaananand A., Shanmugasundaram A. Potential hepatoprotective effect of aqueous extract of *Gracillaria corticata* in AFB₁ induced hepatotoxicity in Wistar rats. J Biol Sci 2008; 8: 1352—1355.
45. Balamurugan B., Muthusamy P. Observation of the hepatoprotective and antioxidant activities of *Trianthema decandra* roots on carbon tetrachloride-treated rats. J Pharmacol 2008; 3: 83—89.
46. Saito A., Yoneda M., Yokohama S., Okada M., Haneda M., Nakamura K. Fucoidan prevents concanavalin A-induced liver injury through induction of endogenous IL-10 in mice. Hepatol Res 2006; 35: 3: 190—198.
47. Tiegs G., Hentschei J., Wendel A. T-cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin. Clin Invest 1992; 90: 196—203.
48. Lasarte J.J., Sarobe P., Boya P. A recombinant adenovirus encoding hepatitis C virus core and E1 proteins protects mice against cytokine-induced liver damage. Hepatology 2003; 37: 2: 461—470.
49. Информационный бюллетень ВОЗ. 2013; 17.
50. Gao X., Cui Q., Shi X., Su J., Peng Z., Chen X., Lei N., Ding K., Wang L., Yu R. Prevalence and trend of hepatitis C virus infection among blood donors in chinese mainland: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis 2011; 11: 88—95.
51. Brok J., Gluud L.L. Meta-analysis: ribavirin plus interferon vs. interferon monotherapy for chronic hepatitis C - an updated cchran review. Aliment Pharmacol Ther 2010; 32: 840—850.
52. Макаренкова И.Д., Дерябин П.Г., Львов Д.К., Беседнова Н.Н. Противовирусная активность сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *L.japonica* в отношении инфекции культур клеток, вызванной вирусом гриппа А птиц (H5N1). Вopr вирусол 2010; 1: 41—43.
53. Hidari K.J.P., Takahashi N., Arihara M. Structure and anti-dengue activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. Biochem Biophys Res Commun 2008; 376: 91—98.
54. Rabanal M., Ponce N.M.A., Navarro D.A., Gomez R.M., Stortz C.A. The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichoma*: chemical analysis and antiviral activity. Carbohydr Polymers 2014; 101: 804—811.
55. Venkateswaran P.S., Millman I., Blumberg B.S. Interaction of fucoidan from *Pelvetia fastigiata* with surface antigens of hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses. Planta Med 1989; 55: 3: 265—270.
56. Mori N., Nakasone K., Tomimori K., Ishikawa C. Beneficial effects of fucoidan in patients with chronic hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol 2012; 18: 18: 2225—2230.
57. Chen K.J., Tseng C.K., Chang F.R., Yang J.L., Yeh C.C., Chen W.C., Wu S.F., Chang H.W., Lee J.C. Aqueous extract of the edible *Gracillaria tenuistipitata* inhibits hepatitis C viral replication via cyclooxygenase-2 suppression and reduces virus-induced inflammation. PLoS One 2013; 28: 145—158.
58. Нагоев Б.С., Понезева Ж.Б. Некоторые аспекты иммунопатологии при хронических гепатитах. Эпидемиология и инфекционные болезни 2009; 6: 45—49.
59. Плахтуй Л.Я., Нагоев Б.С., Отараева Б.И., Тадеева А.К., Уховец А.Ч. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у больных хроническим вирусным гепатитом С. Успехи современнестествознания 2010; 9: 141—143.
60. Choi J., Ou J.H. Mechanisms of liver injury. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006; 290: 5: 847—851.

Вторичные метаболиты микроорганизмов — потенциальный резерв фармацевтических препаратов

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

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Microbial Secondary Metabolites as Potential Reserve of Pharmaceuticals

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

M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow

В обзоре представлены основные характеристики новых биологически активных вторичных метаболитов. Широкий набор новых молекулярных мишеней применяется для обнаружения новых неантибиотических соединений с различной фармакологической активностью (неинфекционные заболевания). Микроорганизмы представляют собой удивительный источник, поскольку образуют новые соединения с широким спектром биологической активности.

Ключевые слова: вторичные метаболиты микроорганизмов, фармакологическая активность, потенциальные лечебные препараты.

The major characteristics of new bioactive microbial secondary metabolites are summarized in the review. A wide range of new molecular targets are implicated in discovery of new nonantibiotic compounds with some other pharmacological activities (noninfectious diseases). Microorganisms represent fascinating resources due to their production of novel products with broad spectra of bioactivities.

Key words: microbial secondary metabolites, pharmacological activity, potential drugs.

Вторичные метаболиты микроорганизмов — это соединения достаточно невысокого молекулярного веса и поразительно разнообразной химической структуры в зависимости от природы микроорганизма и условий культивирования. В большинстве случаев вторичные метаболиты не обязательны для жизненного цикла самого продуцента.

Интерес к вторичным метаболитам возник в связи с тем, что почти все они обладают теми или иными биологическими активностями, существенно важными для нормального функционирования жизненных циклов человека, животных, растений и других живых существ, хотя их роль в жизни самого продуцента большей частью непонятна [1, 2].

В общих чертах вторичные метаболиты по их биологической активности могут быть подразделены на следующие группы: антибиотики, противоопухолевые, противовирусные и антипаразитарные вещества, иммуномодуляторы, ингибиторы ряда биохимических процессов, вызывающих неинфекционные заболевания.

Большинство вторичных метаболитов выделяют из актиномицетов, микроскопических грибов и базидиомицетов, реже из бактерий.

Особенностью скрининга продуцентов метаболитов с конкретными биохимическими свойствами является необходимость разработки модели мишени, на которую должен действовать искомый метаболит *in vitro* или *in vivo*.

В настоящей работе представлены литературные данные, характеризующие биологическую активность микробных вторичных метаболитов, представляющих интерес в качестве потенциальных лечебных препаратов, но не относящихся к собственно антибиотикам. Внимание обращено на вторичные метаболиты, которые могут быть полезными преимущественно для лечения неинфекционных заболеваний.

Современные инструментальные аналитические методы способствуют быстрому и точному установлению химических структур выделенных соединений, что открывает возможности для их модификации.

Материал скомпонован по принципу общности биологической активности. Описанию каждого метаболита предшествует краткое объяснение проблемы, которую в какой-то мере можно решить, используя данный метаболит.

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 119899 Москва, Воробьевы горы. МГУ им. М. В. Ломоносова

1. Метаболиты с противовоспалительной активностью

1.1. Ингибиторы рецепторов хемокинов

Белки хемокины регулируют развитие лейкоцитов, хемотаксис, перенос через везикулярную и лимфатическую системы. Рецепторы CCR2 хемокина расположены преимущественно на моноцитах, макрофагах и Т-клетках. Наиболее важный белок хемокинов MCR-1 имеет большое сродство к CCR2, образуя комплекс MCR-1 — CCR2, что сопровождается такими воспалительными процессами, как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, артросклероз. Нейтрализация CCR2 антагонистами рецептора может снизить вероятность возникновения комплекса и, следовательно, воспалительных процессов [3].

Скрининг микроорганизмов — продуцентов таких антагонистов привёл к выделению грибных культур, синтезирующих соответствующие соединения. Ряд штаммов *Verticimonosporium dipticus* был выделен из почв Аргентины. При ферментации этих культур на предложенных средах образовывалось два класса веществ, предотвращающих образование опухолей суставов грызунов в модельных опытах. Соединения ингибируют образование комплекса CCR2 — MCR-1, т. е. являются ингибиторами рецептора CCR2 [4]. В структурном отношении ингибиторы представлены бис-тио-дикетопиперазинами и цитохалазинами разной степени способности к связыванию.

При ферментации *Steganospora* sp. образуются два противовоспалительных ингибитора рецептора CXCL10 — высокоиндуцибельного аттрактанта, расположенного на макрофагах и Т-лимфоцитах и играющего важную роль в хронических воспалительных состояниях. Эти ингибиторы — диариловые эфиры 3-деметилдигидромалдоксин и дигидромалдоксин сокращают промоторную активность CXCL10, индуцированную системой липополисахарид/интерферон- γ , в ММ6 клетках, и сокращают белковый синтез аттрактанта и его выделение [5].

1.2. Индукция ранних остеобластических маркёров

Остеобласты синтезируют большую часть внеклеточного матрикса костей в эмбриональном развитии и взрослом состоянии. Разрегулирование этого процесса ведёт к возникновению таких костных болезней, как остеопороз. Остеобласты возникают из стволовых клеток брыжейки, дифференцирующихся в различные клеточные линии: остеобласты, хондроциты, миобласты, адипоциты. Стимулируют дифференциацию остеобластов костные морфологические белки, также для остеобластогенеза важны транскрипционные факторы [3, 6]. Во время дифференциации активируются остеобластические маркёры: щелочная фосфатаза,

остеопонтин, коллаген, остеокальцин. Малые молекулы могут стимулировать дифференциацию остеобластов [7] и, соответственно, малые молекулы вторичных метаболитов могут быть использованы в качестве терапевтических средств для лечения костных заболеваний.

При ферментации *Penicillium verruculosum* выделено вещество, идентифицированное как декалпеновая кислота, состоящая из декалина и тетраеновой кислоты. При действии декалпеновой кислоты на MSC клетки в качестве модели индуцировалась активность раннего маркёра дифференциации — щелочной фосфатазы [8].

Среди вторичных метаболитов обнаружены также ингибиторы активности щелочной фосфатазы — трикоциалиды А и В, продуцентов которых является *Trichoderma* sp. FKI-5513 [9].

1.3. Ингибиторы деградации гиалуроновой кислоты

Гиалуроновая кислота (ГК) образуется стволовыми клетками и содержится во внеклеточном матриксе животных тканей. ГК представляет собой полимер, состоящий из повторяющихся дисахаридных единиц (β -1,4)-D-глюкуроновой кислоты и (β -1,3)-N-ацетилглюкозамина. ГК играет ключевую роль в гомеостазе, эмбриональном развитии, заживлении ран, функционирует как структурная молекула в тканях стекловидного тела глаза, как смазка суставов [10, 11], а также для поддержания таких свойств, как упругость и гидратация тканей, создает матрицу, к которой присоединяются белки матрикса, образуя структурные комплексы [12].

Снижение концентрации ГК в межклеточной жидкости сопровождается такими заболеваниями как остеоартроз, ревматоидный артрит, раковые заболевания [11, 12]. Деградация ГК происходит под действием гиалуронидаз — ферментов, присутствующих в различных органах и тканях. В связи с этим ингибиторы гиалуронидазы, предотвращающие разрушение ГК и снижение её концентрации в тканях, полезны в терапии ряда заболеваний [13].

Трансмембранный гликопротеин CD44 является главным поверхностным рецептором ГК клеток различных типов. Свободная ГК связывается с этим рецептором, образуя комплекс, и только в этом комплексе происходит её деградация под действием гиалуронидаз [14, 15].

Вторичные метаболиты микроорганизмов были предложены в качестве ингибиторов образования комплексов CD44-ГК [13]. Скрининг микроорганизмов — продуцентов ингибиторов проводился с использованием мембранной фракции CD44/293 клеток и флуоресцентных конъюгатов ГК. Из культуральной жидкости гриба *Dactyomyces* sp. выделено вещество F-19848A, эффективно ингибирующее связывание ГК в ком-

плекс в бесклеточной системе и менее эффективно — в экспериментах с живыми клетками. Ингибитор представляет собой 2,16,20-триокси-н-гексакосановую кислоту, ОН-группа которой при С-20 этерифицирована трисахаридом, состоящим из двух остатков ксилозы и одного остатка глюкозы. Один из остатков ксилозы и остаток глюкозы ацилированы уксусной кислотой [12]. Подобные структуры имеют антибиотики гликенины [16].

Пять компонентов F-16438 — А, В, Е, F и G выделены из культуральной жидкости гриба *Gloeoporus dichrous*, вещества оказались эффективными ингибиторами связывания ГК и CD44. Структуры компонентов подобны структуре антибиотика калопорозиды, ингибитора фосфолипазы С; основой структуры является та же коксакосановая кислота, но с иными заместителями [10, 11].

Ингибиторы связывания ГК найдены также среди производных пиранов: γ -пиран-липиддепиран получен при ферментации гриба *Neolentinus lepideus* ТМС 1102, γ -пирановый цикл имеет два заместителя — гидроксиметильную и 1,2-дигидрометильную группы [13]. Есть данные, что 6-гексадеканат аскорбиновой кислоты также является ингибитором связывания ГК [17].

2. Антисклеротическая активность

2.1. Ингибиторы образования липидных капель в макрофагах

На ранних стадиях атеросклероза макрофаги проникают внутрь артерий, модифицируют липопротеиды низкой плотности, запасая холестерол и жирные кислоты для образования эфира холестерола — холестерина и триглицеридов в цитозольных липидных каплях. Макрофаги превращаются в жировые клетки, ведущие к развитию атеросклероза артериальных стенок. Ингибиторы образования макрофагами липидных капель могут сдерживать прогрессирование атеросклероза [18].

Описано два способа ингибирования образования липидных капель:

а) ингибирование образования ацил-СоА-синтетазы, где ацил — остаток длинноцепочечной карбоновой кислоты;

б) ингибирование реакции образования ацил-СоА-холестерол-трансферазы (АСАТ).

Скрининг микроорганизмов, синтезирующих селективные ингибиторы ацил-СоА-синтетазы, осуществлялся с помощью специально разработанной модели: макрофаги клеток мышей культивировали с липосомами, содержащими фосфатидилсерин. Липосомы связывались с соответствующими рецепторами, метаболизировались до липопротеинов низкой плотности в цитозоле в виде липидных капель, которые подсчи-

тывались под микроскопом после окраски. Эксперименты проводили без ингибиторов и в присутствии предполагаемых ингибиторов [19].

Из культурального фильтрата *Streptomyces* sp. SK-1894 выделены триаксины А, В, С и D, представляющие собой 11-углеродные алкенильные цепи с общим триазенольным остатком на конце цепи. Соединения были нетоксичны и ингибировали в различной степени активность ацил-СоА-синтетазы. Для медицины наиболее интересен триаксин С [18–20].

Пентацеселиды А, В и С, продуцируемые *Penicillium cecidicola* FKI-1, были выделены из культуральной среды экстракцией и очищены разными видами хроматографии. Компоненты А и В ингибируют синтез эфира холестерола в мышинных макрофагах с I_{50} при концентрациях соответственно 3,65 и 4,7 мкМ без цитотоксичного эффекта. Механизм действия — ингибирование АСАТ [21].

Четыре соединения, названные вертицилидами, синтезируются *Verticillium* sp. FKI-2679. Вещества представляют собой циклодепептиды и ингибируют активность АСАТ. При этом вещества в 5–11 раз более активны против изоэнзима АСАТ2, чем против АСАТ1 [22].

Большинство известных микробных ингибиторов АСАТ селективно по отношению к двум изоэнзимам АСАТ2 и АСАТ1 [23].

2.2. Антигиперлипидемические агенты

Гиперлипидимия — главная проблема инсулиннезависимого диабета. При лечении заболевания используются препараты, мишенью которых являются белки липидного контроля печени и активированные рецепторы адипоцитов.

Для обнаружения новых аналогичных препаратов среди вторичных метаболитов разработан метод скрининга продуцентов антигиперлипидемических соединений. Метод основан на оценке увеличения дифференциации фибробластов мышей в зрелые адипоциты, образующие липидные капли. В результате скрининга выделен штамм *Serratia*, синтезирующий вещество FR177391, обладающее свойствами антилипидемического агента [24].

Вещество снижало образование липидных капель в адипоцитах; при обработке здоровых мышей этим препаратом увеличивалась активность липопротеин-липазы в крови и жировой ткани, снижалось содержание триглицеридов и возрастало относительное содержание липопротеина высокой плотности. У мышей с устойчивым диабетом под действием FR177391 снижался уровень триглицеридов в крови [25, 26]. Вещество представляет собой хлорсодержащий макроциклический лактон, а мишенью его действия является фосфатаза 2А.

Методом микробной трансформации и химическим синтезом получен ряд активных и неактивных производных FR177391 [27].

2.3. Ингибитор глюконеогенеза

Образование глюкозы печенью и поступление её в кровь оценивается как инсулинустойчивый диабет или как инсулин-дефицитный диабет, который можно регулировать снижением биосинтеза глюкозы печенью с помощью специфических ингибиторов.

При скрининге микроорганизмов, синтезирующих такой ингибитор, в качестве мишени использовали первичную культуру синтезирующих глюкозу гепатоцитов крыс. В результате исследования из культуральной жидкости гриба *Phoma* sp. 00144 было выделено вещество, обозначенное как FR225654, ингибирующее образование глюкозы гепатоцитами. Структура ингибитора была установлена и представляет собой высокоокисленный транс-декалиновый цикл и -кетонол с характерной боковой цепью [28].

3. Ингибиторы роста раковых клеток

3.1. Ингибиторы фарнезилтрансферазы

Мутантные онкогены *ras* связывают с нерегулируемым клеточным ростом, а мутированные онкобелки Ras являются одними из наиболее общих генетических отклонений и составляют около 25% всех раков человека [29–33]. Это обстоятельство делает Ras оптимальной мишенью для изучения химиотерапии рака. Три прото-онкогена (H, N, K) кодируют четыре гуаниннуклеотид-связывающих белка H-Ras, N-Ras, K-RAS4A, K-Ras4B, структурно родственных и мембранно-связанных. Эти белки играют ключевую роль в контроле клеточной пролиферации и дифференциации.

Для трансформации клеток и их нормально-го функционирования белки Ras после трансляции должны быть локализованы в плазматической мембране определённым образом, типичным для мембранно-связанных белков. В случае белка H-Ras неправильная локализация онкобелка возникает лишь при этерификации SH-группы цистеина С-концевого фрагмента этого белка фарнезильной группой при действии фарнезилтрансферазы (ФТФ). Затем протеаза удаляет три аминокислоты с С-конца онкобелка, оставшийся С-концевой цистеин метилируется под действием метилазы. При нарушении этих преобразований теряется роль Ras белка в пролиферации и дифференциации клеток. На поиски ингибиторов ФТФ направлены большие усилия [34, 35].

Выявлено около 10 типов соединений и 60 индивидуальных веществ, синтезируемых микроорганизмами (бактерии, актиномицеты, грибы) и ингибирующих в различной степени активность ФТФ [33]. Так, трициклический ингибитор ФТФ, SchH66336 и метилхинолон R115777 демонстрировали стабилизацию или объективное

улучшение у 32% пациентов с различными видами лейкозов.

При скрининге ингибиторов ФТФ были получены два производных аклациномицина А (АКЛ) — N-бензил-АКЛ и N-аллил-АКЛ, которые ингибировали активность фермента, не влияя на активность геранилгеранил-трансферазы или геранилгеранил-пирофосфатсинтетазы. В культуре клеток A431 оба производных блокировали мембранную локализацию H-Ras, а также эпидермальный фактор роста [35], индуцирующий миграцию этих клеток.

Микроорганизмы продолжают быть перспективными потенциальными источниками ингибиторов фарнезилтрансферазы.

3.2. Ингибиторы миграции раковых клеток

При скрининге среди стрептомицетов ингибиторов миграции раковых клеток выделен штамм *Streptomyces* M1264, образующий миграцины А и В. Эти вещества ингибируют миграцию клеток лёгочной карциномы MD A-MB 231 человека, клеток лёгочной аденокарциномы, фибросаркомы HT-1080 человека. Миграцины не токсичны и могут стать ингибиторами метастазов рака. Химические структуры миграцинов близки структурам люминацинов [36].

4. Ингибиторы эластазы

Структурный белок эластин, представляющий собой волокна, придающие эластичность и упругость таким тканям, как кожа, лёгкие, связки, стенки артерий и др., имеет важное значение для развития и дифференциации тканей, гомеостаза, при прогрессировании болезней. Эти свойства могут быть утрачены при действии нейтрофильной эластазы, образуемой в азурофильных гранулах нейтрофилов.

Сериновая протеаза — эластаза обладает широкой субстратной специфичностью и, кроме эластина, может гидролизовать другие белки матрикса — коллаген, фибронектин, ламинин, протеогликан и др. [37]. Баланс деградации и биосинтеза эластина может быть достигнут действием ингибиторов эластазы. В этом отношении вторичные метаболиты микроорганизмов представляют определённый интерес.

Из культуральных фильтратов актиномицетов выделен ряд ингибиторов эластазы: эласин [38], элафин [39], эластатинал [40]. Многие штаммы аспергилл также синтезируют ингибиторы эластазы. Ингибиторы эластазы обнаружены в культуральных фильтратах большинства штаммов *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus flavus* [41]. Те же штаммы синтезировали эластазу, причём эластаза и её ингибитор синтезировались попеременно с интервалом 3–4 дня [42].

Ингибитор эластазы AFUEI, выделенный из *Aspergillus fumigatus*, охарактеризован достаточно

подробно. Это белок, содержащий 68 аминокислот, установлена их последовательность. Белок не содержит триптофана, но содержит три ароматические аминокислоты — два тирозина и фенилаланин, молекулярная масса 7525 Da.

Ингибитор эластазы AFUA из *A.fumigatus* 3G14940 — белок, имеющий в структуре в положении 20—87 участок, гомологичный аминокислотному составу ингибитора AFUEI, и обладающий теми же свойствами. Ингибитор AFUA термостабилен, ингибирует активность эластазы из гриба-продуцента и лейкоцитов, но не фермента из поджелудочной железы свиньи и змеиного яда. Инактивирующая активность не снижается под действием восстанавливающих агентов [37, 41].

У больных с нарушенным иммунитетом часто развивается аспергиллёз или общий микоз, возбудителями которого являются аспергиллы, устойчивые к антигрибным антибиотикам. Синтезируемая ими эластаза скорее всего, является патогенным фактором поскольку может разрушать ткани, содержащие эластин — лёгочная ткань содержит 25% эластина. Исследователи ингибиторов эластазы пришли к выводу, что эти вещества должны быть эффективными в качестве терапевтических агентов против аспергиллёза [37].

5. Ингибиторы вирусов

5.1. Ингибиторы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)

Комбинированное терапевтическое лечение ВИЧ-инфицированных пациентов с использованием ингибиторов инверсивной транскриптазы и протеазы сокращает число вирусных частиц в крови, но не приводит к полному излечению из-за частых мутаций вируса [42]. В связи с этим происходит постоянный поиск более эффективных и менее токсичных препаратов с различными молекулярными мишенями в цикле вирусной репликации.

Вторичные метаболиты микробного происхождения дают в этом отношении определённый шанс. Проводится скрининг микроорганизмов на синтез веществ, ингибирующих внедрение вируса в клетку, а затем вирусной ДНК в геном хозяина путём специфических реакций рекомбинации.

Внедрение вируса в чувствительные клетки начинается со связывания вирусного гликопротеинового пакета gp120 с поверхностным рецептором — трансмембранным белком CCR5, расположенным на моноцитах, макрофагах и Т-клетках [42, 43]. Пакет gp120 высокогликозилирован, половина его молекулярной массы приходится на 13 гликанов смешанного типа и 11 гликанов маннозилированного типа. Ингибирование активности рецептора снижает возможность связывания вируса ВИЧ с клеткой и, следовательно, проникновения его в клетку.

Новый вторичный метаболит 213766 был выделен из ферментационной среды гриба *Chaetomium globosum* и ингибировал активность хемокин рецептора CCR5. Структура вещества установлена с помощью спектральных данных и представляет собой метиловый эфир тетрамовой кислоты. Вещество относится к многочисленному классу антибиотиков тетрамовой группы, в основе молекулы которых лежит структура тетрамовой кислоты (2,4-пирролидин-дион) [43—45]. Эти соединения активны против различных микроорганизмов, включая устойчивые микробные патогены, но, в отличие от метилового эфира тетрамовой кислоты и самой тетрамовой кислоты, не являются ингибиторами CCR5 рецептора. Метиловый эфир более сильный ингибитор CCR5, чем свободная тетрамовая кислота [45].

Из культуральной жидкости базидиомицета *Tyromyces chironex* выделен сесквитерпен кадинан, его структура была установлена спектральными методами. Вещество представляет собой (4 β ,14-дигидрокси-6 α ,7 β H(10)-кадинен и проявляет значительную анти-ВИЧ активность — EC₅₀ 3,0 мкг/мл при селективности 25,4, цитопатический эффект измерен подсчётом образовавшихся мультитядерных клеток и составляет 76,9 мкг/мл [46].

Актинохивин (АН) — мощный анти-ВИЧ лектин, образуемый актиномицетом *Longispora albida*, представляет собой белок, содержащий 114 остатков аминокислот, скомпонованных в три tandemных повторности: 1—38, 39—76 и 77—114 (1,2 и 3 соответственно) [47, 48]. По ряду признаков АН относится к углеводсвязывающему семейству белков, вследствие чего каждая из последовательностей 1,2 и 3 связывается с высокоманнозилированным gp120 фрагментом ВИЧ-вируса, предотвращая его связывание с клеткой [49,50]. Для антивирусного эффекта важны аминокислотные остатки сегментов лектина: в сегменте 1 — Asp₁₅, Tyr₂₃, Leu₂₅, Asn₂₈ и Tyr₃₂, в сегменте 2 — Tyr₆₁, в сегменте 3 — Tyr₉₉. Ряд аминокислот в сегментах являются незаменимыми [47, 50].

Были сконструированы димеры АН по типу голова-хвост фузией двух молекул АН, в качестве связующего звена использовали фрагмент токсина рицина His-TEV-АН/РТВ(132—143). Димеры были получены препаративно с использованием системы экспрессии в *E.coli* и имели в 2—30 раз большую антивирусную активность, чем АН. Димер АН может быть кандидатом на внедрение в медицинскую практику как предотвращающий попадание вируса ВИЧ в клетку [48, 50].

Вирусный фермент интегразы является ключевым в метаболическом цикле вируса и репликации вируса в клетке хозяина. ДНК вируса ВИЧ внедряется в геном хозяина специальной реакцией рекомбинации, в которой вирусная интеграза играет основную роль. Многие синтетические и

природные ингибиторы интегразы показали лишь незначительную специфичность, но есть и удачные поиски ингибиторов интегразы среди вторичных метаболитов грибов.

Из культуральной жидкости *Penicillium* sp. FKI 1463 выделен ряд феноленонов, которые были испытаны в качестве ингибиторов активности интегразы. Несколько соединений, близких по структуре и относящихся к группе феноленонов, в различной степени ингибировали активность интегразы вируса ВИЧ и подавляли развитие этого вируса. Однако большинство соединений было цитотоксично. Один из выделенных феноленонов ингибировал ВИЧ-интегразу с $IC_{50}=10$ мкМ и был селективен (анти-ВИЧ $IC_{50}=1,7$ мкМ, цитотоксичность $IC_{50}=87$ мкМ) [51].

Аспохалазин был выделен из ферментационной среды почвенного гриба *Aspergillus flavipes*. Химическая структура вещества установлена анализом спектральных данных и сравнением с известными аспохалазинами. Вещество было активно против ВИЧ-интегразы с $IC_{50}=71,67$ мкМ [52]. Аспохалазины — грибные метаболиты, известные как цитохалазины, представляют собой макроциклические 11,14 или 14-членные системы, которые могут включать эфирную связь [52].

5.2. Другие вторичные метаболиты с антивирусным действием

Гелданамицин синтезируется *Streptomyces hygroscopicus* и является специфическим ингибитором HSp90 белка — клеточной мишени для противораковых агентов. Структурно антибиотик представляет собой бензохинон ансамицина. Соединение плохо растворимо в воде и токсично, однако химическое модифицирование молекулы позволило несколько снизить эти недостатки [53].

Гелданамицин интересен тем, что одновременно с противораковым действием он обладает

и противовирусной активностью. Антибиотик ингибирует *in vitro* и *in vivo* вирус герпеса типа 2 при различных условиях инфицирования вирусом, однако токсичность препарата сдерживает его применение на практике [54].

Производные гелданамицина, полученные замещением в положении 17 молекулы алифатической циклической группой или полярной фосфатной группой, обладают мощной активностью против вируса гепатита С [55].

Полиэфирный антибиотик СР-44161, первоначально описанный как антикокцидиальный препарат, также активен против вируса герпеса типов 1 и 2 *in vitro* и *in vivo*, а также против стригущего лишая [56, 57].

Заключение

Как видно из представленного материала, биологически активные вторичные метаболиты микроорганизмов способны регулировать жизненно важные процессы в животных клетках.

Многие метаболиты эффективны, малотоксичны, достаточно селективны, не вызывают иммунодепрессии, хорошо растворимы в воде и могли бы быть использованы в качестве лекарственных препаратов. Вещества образуют природный резерв для получения важных для терапевтической практики препаратов.

Кроме того, первичные химические структуры активных метаболитов являются природной подсказкой того, соединения какого типа предпочтительны для получения желаемого эффекта.

Работа по введению перспективных микробных метаболитов в практику требует времени и затрат, но необходимость развития этой отрасли исследований очевидна.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. Personal view. J Antibiot 2005; 58: 1: 1—26.
2. Aminov R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Environ Microbiol 2009; 11: 12: 2970—2988.
3. Yamaguchi A., Komori T., Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. Endocrine Rev 2000; 21: 4: 393—411.
4. Herath K.B., Jayasuriya H., Ondeyka J.G. et al. Isolation and structures of novel fungal metabolites as chemokine receptor (CCR2) antagonists. J Antibiot 2005; 58: 4: 686—694.
5. Schreiber D., Jung M., Sandjo L.P. et al. 3'-Demethyldihydromaldoxin and dihydromaldoxin, two anti-inflammatory diaryl ethers from a *Steganospora* species. J Antibiot 2012; 65: 9: 473—477.
6. Rodan G.A., Martin T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. Science 2000; 289: 1508—1514.
7. Wu X., Ding S., Ding Q. et al. A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. J Am Chem Soc 2002; 124: 49: 14520—14521.
8. Sakamoto S., Kojima F., Igarashi M. et al. Decalpenic acid, a novel small molecule from *Penicillium verrucosum* CR37010, induces early osteoblastic markers in pluripotent mesenchymal cells. J Antibiot 2010; 63: 12: 703—708.
9. Fucuda T., Uchida R., Ohte S. et al. Trichocyalides A and B, new inhibitors of alkaline phosphatase activity in bone morphogenetic protein-stimulated myoblasts, produced by *Trichoderma* sp. FKI-5513. J Antibiot 2012; 65: 11: 565—569.
10. Harada H., Nakata T., Hirota-Takahata Y. et al. F-16438s, novel binding inhibitors of CD44 and hyaluronic acid. I. Establishment of an assay method and biological activity. J Antibiot 2006; 59: 12: 770—776.
11. Hirota-Takahata Y., Harada H., Tanaka I. et al. F-16438s, novel binding inhibitors of CD44 and hyaluronic acid. II. Producing organism, fermentation, isolation, physico-chemical properties and structural elucidation. J Antibiot 2006; 59: 12: 777—784.
12. Hirota-Takahata Y., Harada H., Tanaka I. et al. F-19848A, a novel inhibitor of hyaluronic acid binding to cellular receptor CD44. J Antibiot 2007; 60: 10: 633—639.
13. Hosoe T., Sakai H., Ichikawa M. et al. Lepidepyrone, a new γ -pyrone derivative, from *Neolentinus lepideus*, inhibits hyaluronidase. J Antibiot 2007; 60: 6: 388—390.
14. Harada H., Takahashi M. CD44-Dependent intracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. J Biol Chem 2007; 282: 8: 5597—5607.
15. Culty M., Nguyen H.A., Underhill C.B. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. J Cell Biol 1992; 116: 4: 1055—1062.

16. Nishida F., Mory Y., Isobe S. et al. Structures of deacetyl glykenins — A,B, and C, glycosidic antibiotics from *Basidiomycetes* sp. *Tetrahedron Lett* 1988; 29: 5287—5290.
17. Alexander B., Daniel J.R., Stephan B. et al. L-Ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. *J Biol Chem* 2004; 279: 44: 45990—45997.
18. Matsuda D., Namatame I., Ohshiro T. et al. Anti-atherosclerotic activity of triacsin C, an acyl-CoA synthetase inhibitor. *J Antibiot* 2008; 61: 5: 318—321.
19. Namatame I., Tomoda H., Arai H. et al. Complete inhibition of mouse macrophage-derived foam cell formation by triacsin C. *J Biochem* 1999; 125: 2: 319—327.
20. Omura S., Tomoda H., Xu Q.M. et al. Triacsins, new inhibitors of acyl-CoA synthetase produced by *Streptomyces* sp. *J Antibiot* 1986; 39: 9: 1211—1218.
21. Yamazaki H., Kobayashi K., Matsuda D. et al. Pentacecilides, new inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced by *Penicillium cecidicola*. *J Antibiot* 2009; 62: 4: 195—200.
22. Ohshiro T., Matsuda D., Kazuhiro T. et al. New verticilides, inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, produced by *Verticillium* sp. *FKI* 2679. *J Antibiot* 2012; 65: 5: 255—262.
23. Ohshiro T., Rudel L.L., Omura S., Tomoda H. Selectivity of microbial acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitors toward isozymes *J Antibiot* 2007; 60: 4: 43—51.
24. Sato B., Nakajima H., Fujita T. et al. FR177391, a new anti-hyperlipidemic agent from *Serratia*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties, structure elucidation and biological activities. *J Antibiot* 2005; 58: 10: 634—639.
25. Inami M., Kawamura I., Tsujimoto S. et al. FR177391, a new anti-hyperlipidemic agent from *Serratia*. II. Pharmacological activity of FR177391. *J Antibiot* 2005; 58: 10: 640—647.
26. Kobayashi M., Sato K., Yoshimura S. et al. FR177391, a new anti-hyperlipidemic agent from *Serratia*. III. Microbial conversion of FR177391 and synthesis of FR177 derivatives for its target protein screening by chemical genetic approaches. *J Antibiot* 2005; 58: 10: 648—653.
27. Yamaoka M., Sato K., Kobayashi M. et al. FR177391, a new anti-hyperlipidemic agent from *Serratia*. IV. Target identification and validation by chemical genetic approaches. *J Antibiot* 2005; 58: 10: 654—652.
28. Ohtsu Y., Sasamura H., Shibata T. et al. The novel gluconeogenesis inhibitor FR225654 that originates from *Phoma* sp. No.00144. *J Antibiot* 2005; 58: 7: 452—455.
29. Gibbs J. B. Ras C-terminal processing enzymes — new drug targets? *Cell* 1991; 65: 1: 1—4.
30. Bos J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 17: 4682—4689.
31. Barbacid M. Ras genes. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 779—827.
32. Iwasaki S., Omura S. Search for protein farnesyltransferase inhibitors of microbial origin: our strategy and results as well as the results obtained by other groups. *J Antibiot* 2007; 60: 1: 1—12.
33. Ayral-Kaloustian S., Salaski E.J. Protein farnesyltransferase inhibitors. *Curr Med Chem* 2002; 9: 10: 1003—1032.
34. Halushka P., Dy G.K., Adjei A.A. Farnesyltransferase inhibitors as anti-cancer agents. *Eur J Cancer* 2002; 38: 13: 1685—1700.
35. Magi S., Shitara T., Takemoto Y. et al. Novel derivatives of aclacinomycin A block cancer cell migration through inhibition of farnesyltransferase. *J Antibiot* 2013; 66: 3: 165—170.
36. Arai Y., Inuma H., Ikeda Y. et al. Migracins A and B, new inhibitors of cancer cell migration, produced by *Streptomyces* sp. *J Antibiot* 2013; 66: 4: 225—230.
37. Okumura Y., Matsui T., Ogawa K. et al. Biochemical properties and primary structure of elastase inhibitor AFUEI from *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 2008; 57: 7: 803—808.
38. Ohno H., Yoshida M., Takahashi Y., Omura S. Improvement of the productivity of elasnin, a specific elastase inhibitor by *Streptomyces nobori-toensis* KM-2753. *J Antibiot* 1980; 33: 5: 474—479.
39. Wiedow O., Schroder J.M., Gregory H. et al. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1990; 265: 25: 14791—14795.
40. Umehara H., Aoyagi T., Okura A. et al. Letter: elastatinal, a new elastase inhibitor produced by actinomycetes. *J Antibiot* 1973; 26: 12: 787—789.
41. Okumura Y., Ogawa K., Nikai T. Elastase and elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *J Med Microbiol* 2004; 53: 5: 351—354.
42. Yang S-W., Mierzwa R., Terracciano J. et al. Sch 213766, a novel chemokine receptor CCR-5 inhibitor from *Chaetomium globosum*. *J Antibiot* 2007; 60: 8: 524—528.
43. Pillay D. Current patterns in the epidemiology of primary HIV drug resistance in North America and Europe. *Antiviral Therapy* 2004; 9: 5: 695—702.
44. Yang S-W., Mierzwa R., Terracciano J. et al. Chemokine receptor CCR-5 inhibitors produced by *Chaetomium globosum*. *J Nat Prod* 2006; 69: 7: 1025—1028.
45. Segeth M.P., Bonnefoy A., Bronstrup M. et al. Coniosetin, a novel tetracyclic acid antibiotic from *Coniochaeta ellipsoidea* DSM 13856. *J Antibiot* 2003; 56: 2: 114—122.
46. Liu D-Z., Wang F., Yang L-M. et al. A new cadinane sesquiterpene with significant anti-HIV-1 activity from the cultures of the basidiomycete *Tyromyces chioneus*. *J Antibiot* 2007; 60: 5: 332—334.
47. Takahashi A., Inokoshi J., Tsunoda M. et al. Actinohivin: specific amino acid residues essential for anti-HIV activity. *J Antibiot* 2010; 63: 11: 661—665.
48. Hoorelbeke B., Huskens D., Férr G. et al. Actinohivin, a broadly neutralizing prokaryotic lectin, inhibits HIV-1 infection by specifically targeting high-mannose-type glycans on the gp120 envelope. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 8: 3287—3301.
49. Tanaka H., Chiba H., Inokoshi J. et al. Mechanism by which the lectin actinohivin blocks HIV infection of target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 37: 15633—15638.
50. Takahashi A., Inokoshi J., Hachiya A. et al. The high-mannose-type glycan binding lectin actinohivin: dimerization greatly improves anti-HIV activity. *J Antibiot* 2011; 64: 8: 551—557.
51. Shiomi K., Matsui R., Isozaki M. et al. Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J Antibiot* 2005; 58: 1: 65—68.
52. Rochfort S., Ford J., Ovenden S. et al. A novel aspothalasin with HIV 1 integrase inhibitory activity from *Aspergillus flavipes*. *J Antibiot* 2005; 58: 4: 279—283.
53. Liu X., Li J., Ni S. et al. A pair of sulfur-containing geldanamycin analogs, 19-S-methylgeldanamycin and 4,5-dihydro-19-S-methylgeldanamycin, from *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *J Antibiot* 2011; 64: 7: 519—522.
54. Li Y-H., Lu Q-N., Wang H-Q. Geldanamycin, a ligand of heat shock protein 90, inhibits herpes simplex virus type 2 replication both *in vitro* and *in vivo*. *J Antibiot* 2011; 64: 12; 65: 10: 509—512.
55. Shan G-z., Peng Z-g., Li Y-h. et al. A novel class of geldanamycin derivatives as HCV replication inhibitors targeting on Hsp90: synthesis, structure-activity relationships and anti-HCV activity in GS43 replicon cells. *J Antibiot* 2011; 64: 12: 177—182.
56. Yamagishi Y., Ueno M., Ueno C. et al. Anti-herpes virus activity of polyether antibiotic CP-44161 *in vivo*. *J Antibiot* 2009; 62: 2: 95—98.
57. Yamagishi Y., Ueno C., Kato A. et al. Discovery of anti-varicella zoster virus activity of polyether antibiotic CP-44161. *J Antibiot* 2009; 62: 2: 89—93.

**БЫСТРОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ЦЕЛОГО ГЕНОМА
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ
МИКРООРГАНИЗМОВ В КЛИНИЧЕСКИХ ПРОБАХ.**

**RAPID WHOLE-GENOME SEQUENCING FOR DETECTION
AND CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS
DIRECTLY FROM CLINICAL SAMPLES / H. HASMAN,
D. SAPUTRA, T. SICHERITZ-PONTEN, O. LUND, C. AABY
SVENDSEN, N. FRIMODT-MØLLER, F. M. AARESTRUP* //**
**J. CLINICAL MICROBIOLOGY JANUARY 2014;
52: 1: 139–146.**

Секвенирование целого генома (СЦГ) становится рутинным методом в клинической микробиологии. Он применим непосредственно к клиническим пробам, может снизить время диагностики и, следовательно, улучшить контроль и лечение. Основное затруднение состоит в наличии быстрого и надёжного биоинформативного инструмента. Задачей настоящего исследования было оценить применимость СЦГ непосредственно к клиническим образцам и разработать легко используемые биоинформационные инструменты для анализа результатов секвенирования. Тридцать пять рандомизированных проб мочи, взятых у больных с предполагаемыми инфекциями мочевого тракта, были проверены традиционными микробиологическими методами, а также СЦГ выделенных бактерий и прямым секвенированием осадков в пробах мочи. Был разработан быстрый метод анализа данных секвенирования. Культивировали бактерии из 19 проб, но чистые культуры были получены из 17 проб. СЦГ улучшало идентификацию культивируемых бактерий и его данные почти полностью совпадали с фенотипическими данными и прогнозируемой антимикробной чувствительностью. При прямом сравнении результатов СЦГ культур бактерий и клинических проб наблюдалось полное совпадение по видовой идентификации, мультилокусному типированию и филогенетическим связям у штаммов *Escherichia coli* и *Enterococcus faecalis*. Прямое секвенирование клинических проб давало возможность идентифицировать бактерии в полимикробных образцах. В некоторых негативных пробах были выявлены патогенные штаммы. Непосредственное СЦГ в клинических пробах может обеспечить клинически значимой информацией и резко снизить время постановки диагноза. Метод может быть очень полезен, препятствием для его применения в клинике является необходимость анализа его результатов. В настоящем исследовании разработан доступный биоинформационный метод, разрешающий данную проблему.

* National Food Institute, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.

**ARG-ANNOT, НОВЫЙ БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ
СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОВ
АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ
В БАКТЕРИАЛЬНОМ ГЕНОМЕ.**

**ARG-ANNOT, A NEW BIOINFORMATIC TOOL TO
DISCOVER ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN
BACTERIAL GENOMES / S. K. GUPTA, B. R.
PADMANABHAN, S. M. DIENE, R. LOPEZ-ROJAS,
M. KEMPF, L. LANDRAUD, J.-M. ROLAIN* //**
**ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY
JANUARY 2014; 58: 1: 212–220.**

ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation) — новый биоинформационный способ определения предполагаемых и существующих генов антибиотикоустойчивости (АУ) в геноме бактерии. ARG-ANNOT, используя локальную BLAST программу в Bio-Edit программном обеспечении, даёт возможность анализировать последовательности, не обращаясь к Интернету (Web interface). Все генетические детерминанты АУ были собраны из опубликованных работ и онлайн ресурсов, а нуклеотидные и белковые последовательности — из базы данных NCBI GenBank. После создания БД, включающей 1689 генов АУ, слепым методом были протестированы 100 рандомизированных последовательностей, взятых из БД, для подтверждения 100% чувствительности и специфичности, даже в случае, когда некоторые последовательности подвергались сомнению. Надо заметить, что результаты BLAST анализа, полученные с последовательностью *rmtF* гена (последовательность гена нового аминогликозид-модифицирующего фермента, не включённого в БД) как вызывающей сомнение, показали, что указанный метод способен установить связь данной последовательности с короткими последовательностями (от 17 до 40 тпн), обнаруженными в других генах *rmtF* семейства с высоким значением E. Анализ геномов 178 штаммов *Acinetobacter baumannii* и 20 штаммов *Staphylococcus aureus* позволил выявить гораздо большее число генов АУ, чем при использовании генного анализатора Resfinder, а также 11 точечных мутаций в генах-мишенях, ассоциированных с АУ. Среднее время анализа генома составило $3,35 \pm 0,13$ мин. Итак, сообщается о создании БД для BLAST с использованием Bio-Edit программного обеспечения, с помощью которой можно определять генетические детерминанты АУ и быстро и легко выявлять предполагаемые новые генетические детерминанты АУ.

* Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UMR CNRS 7278-IRD 198 IHU, Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille, France.

ЭВОЛЮЦИЯ АНТИМИКРОБНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ *IN VIVO* В СЕРИИ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ БОЛЬНОГО: ПОЛНАЯ КАРТИНА ИЛИ ПОУЧИТЕЛЬНАЯ ИСТОРИЯ?

***IN VIVO* EVOLUTION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN A SERIES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PATIENT ISOLATES: THE ENTIRE PICTURE OR A CAUTIONARY TALE? / S. J. VAN HAL, J. A. STEEN, B. A. ESPEDIDO, S. M. GRIMMOND, M. A. COOPER, M. T. G. HOLDEN, S. D. BENTLEY, I. B. GOSBELL, S. O. JENSEN* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 2: 363—367.**

Задачей исследования было расширить представление об *in vivo* эволюции антибиотикоустойчивости, особенно в случае экспозиции с ванкомицином. Были секвенированы и проанализированы целые геномы 6 последовательных гемокультур метициллиноустойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* (ST239-MRSA-III), выделенных от одного и того же больного после экспозиции с различными антимикробными препаратами за более чем 77-дневный период. Вариантный анализ выявил существование нечувствительной суб-популяции, ведущей происхождение от общего чувствительного предка, с преобладающим циркулирующим клоном (клонами), селекционированным как типом антибиотика, так и продолжительностью экспозиции с ним. Данное исследование высветило динамическую природу эволюции бактерий, а также что нечувствительная суб-популяция может появиться из множества вариантов при экспозиции с антибиотиком. С точки зрения диагностики это имеет непосредственное значение для отбора проб, когда секвенирование целого генома является инструментом для ведения клинической терапии. Что касается бактериемии, полное секвенирование бактериальной ДНК непосредственно в пробах крови больного позволит избежать систематической ошибки оценки культуры и идентифицировать мутации, связанные с циркулирующими нечувствительными суб-популяциями, некоторые из которых обеспечивают перекрёстную устойчивость к альтернативным лекарственным средствам.

* School of Medicine, University of Western Sydney, Penrith, NSW 2751, Australia.

ОЦЕНКА МЕТОДА ЗОНДИРОВАНИЯ ЛИНИИ AID ESBL ДЛЯ БЫСТРОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА (ESBL) И KPC КАРБАПЕНЕМАЗЫ У ENTEROBACTERIACEAE.

EVALUATION OF THE AID ESBL LINE PROBE ASSAY FOR RAPID DETECTION OF EXTENDED-SPECTRUM

β -LACTAMASE (ESBL) AND KPC CARBAPENEMASE GENES IN ENTEROBACTERIACEAE / G. V. BLOEMBERG*, S. POLSFUSS, V. MEYER, E. C. BÖTTGER, M. HOMBACH // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 1: 85—90.

Оценивали метод зондирования линии AID ESBL для определения у Enterobacteriaceae генов бета-лактамаз расширенного спектра (EBLS) и KPC карбапенемазы. Метод AID ESBL был проверен на точность зондирования с помощью продуктов ПЦР, полученных из клинических ESBL штаммов Enterobacteriaceae, содержащих ESBL гены TEM, SHV и CTX-M и KPC гены, а также продуктов ПЦР синтеза, полученных от штаммов, содержащих TEM и SHV дикого типа. Чувствительность и специфичность определяли тестированием набора из 424 клинических штаммов Enterobacteriaceae, включающего 170 штаммов, не продуцирующих TEM, SHV, CTX-M и KPC, чтобы выяснить возможность получения ложных положительных сигналов. Было показано, что метод линейного зондирования определял со 100% точностью ESBL гены по олигонуклеотидным зондам, используемым в данном методе. Тестирование набора из 424 клинических штаммов Enterobacteriaceae продемонстрировало 100% чувствительность и специфичность при определении и дифференциации TEM, SHV и CTX-M генов, имеющихся в этой группе. Также точно методом линейного зондирования были определены KPC гены. Метод зондирования линии AID ESBL является точным и удобным в исполнении для определения ESBL и KPC генов и может быть легко использован в диагностической лаборатории.

* Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich, 8006 Zürich, Switzerland.

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА АГАРОВОЙ СРЕДЫ *BRILLIANCE™* CRE ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К КАРБАПЕНЕМАМ ENTEROBACTERIACEAE С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОЛЛЕКЦИИ ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ИЗ ГРЕЦИИ.

LABORATORY EVALUATION OF *BRILLIANCE™* CRE AGAR FOR SCREENING CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE: PERFORMANCE ON A COLLECTION OF CHARACTERISED CLINICAL ISOLATES FROM GREECE / S. D.KOTSAKIS, E. PETINAKI, E. SCOPES, E. SIATRAVANI, V. MIRIAGOU, E. TZELEPI* // JOURNAL OF GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE JUNE 2013; 1: 2: 85-90.

Oxoid *Brilliance™* CRE Agar (BCRE) предназначен для выявления устойчивых к карбапенемам Enter-

obacteriaceae, при этом использовалась коллекция клинических штаммов энтеробактерий ($n=175$) и неферментирующих бактерий ($n=55$) с известными механизмами устойчивости к беталактамам и уровнем чувствительности к карбапенемам. BCRE поддерживал рост 100 из 108 штаммов энтеробактерий, нечувствительных, по крайней мере, к одному карбапенему, и 57 из 67 карбапенемочувствительных штаммов. Восемь нечувствительных штаммов, не растущих на BCRE, были продуцентами карбапенемаз, имели низкие значения МПК и были нечувствительны только к одному карбапенему. Всего в исследование были включены 107 штаммов энтеробактерий, образующих карбапенемазу, 16 штаммов не росли на среде и были либо чувствительными ($n=8$), либо с промежуточной чувствительностью ($n=5$) к карбапенемам. Из 10 оставшихся чувствительных к карбапенемам штаммов энтеробактерий, 1 штамм продуцировал карбапенемазу, у остальных имелись другие различные сильные механизмы устойчивости к беталактамам. Среда обеспечивала рост почти всех карбапенемоустойчивых неферментирующих штаммов, которые чётко отличались от Enterobacteriaceae по цвету колонии и морфологии.

*Laboratory of Bacteriology, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece.

СНИЖЕННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ВАНКОМИЦИНУ У ИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ОТНОСЯЩИХСЯ К СИКВЕНС-ТИПУ 59: ХОД ЭВОЛЮЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЦЕЛОГО ГЕНОМА.

REDUCED SUSCEPTIBILITY TO VANCOMYCIN IN ISOGENIC *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS OF SEQUENCE TYPE 59: TRACKING EVOLUTION AND IDENTIFYING MUTATIONS BY WHOLE-GENOME SEQUENCING / C.-J. CHEN, M.-H. LIN, J.-C. SHU, J.-J. LU* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 2: 349—354.

Увеличивается число сообщений о развитии у метициллиноустойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA) с различным генетическим фоном фенотипов VISA (промежуточная чувствительность к ванкомицину) и hVISA (гетерогенная промежуточная чувствительность к ванкомицину). Была прослежена генетическая эволюция в процессе развития нечувствительности к ванкомицину у штаммов господствующего азиатского внебольничного клона MRSA, относящегося к сиквенс-типу 59 (ST 59). ST 59 штаммы были последовательно выделены от больного, безуспешно лечившегося от инфекции коленного сустава на

протяжении 15 мес. Секвенированием целого генома двух штаммов, характеризующихся фенотипами VSSA (чувствительность к ванкомицину) и VISA, были определены генетические мутации, ассоциирующиеся с VISA фенотипами. Последовательно мутации были найдены в других штаммах. Сопоставлением накапливающихся мутаций с чувствительностью к ванкомицину была прослежена генетическая эволюция в масштабе целого генома. В процессе развития VISA фенотипа были идентифицированы 9 несинонимических мутаций и две ступени генетической эволюции. Первая ступень включала бессмысленную мутацию в *agrC* и точечные мутации в 5 других локусах, ассоциированных с превращением VSSA в hVISA. Мутации в *rpoB* и *fusA*, последовавшие после применения рифампицина и фузидиевой кислоты, были установлены на второй ступени эволюции, которая соответствовала развитию двойственной устойчивости к рифампицину и фузидиевой кислоте и превращению hVISA в VISA. *In vivo* генетическая эволюция *S. aureus* в процессе развития возрастающей нечувствительности к ванкомицину носила ступенчатый характер и была связана с применением антимикробных препаратов.

* Department of Laboratory Medicine, Chang Gung Memorial Hospital, Linkou, Taoyuan, Taiwan.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОЧНЫХ ЗНАЧЕНИЙ МПК ВАНКОМИЦИНА ДЛЯ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВОГО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* МЕТОДОМ МИКРОРАЗВЕДЕНИЙ.

DETERMINING ACCURATE VANCOMYCIN MIC VALUES FOR METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BY THE MICRODILUTION METHOD / J. A. LEPE*, J. DOMÍNGUEZ-HERRERA, J. PACHÓN, J. AZNAR // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 1: 136—138.

Задачей исследования было смоделировать стандартный метод микроразведений в бульоне на основе модифицированной функции Gompertz'a для получения точных значений МПК ванкомицина у метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA) и оценить влияние этих значений МПК на достижение терапевтического показателя отношения $AUC_{0-24}/МПК \geq 400$. Для создания модели были использованы 3 клинических MRSA штамма с различными значениями МПК. Оптическая плотность (ОП) для каждого значения МПК была смоделирована методом нелинейной регрессии, с использованием F-теста. Для получения значений МПК данные ОП были приведены в соответствие с уравнением Gompertz'a. Среднюю величину AUC_{0-24} рассчитывали, исходя из

режима 30 мг/кг/сутки, на модели Монте Карло по фармакокинетическим данным 5000 пациентов, леченных ванкомицином. в одной и той же больнице. Хотя значения МПК, полученные с помощью разработанной модели, были ниже данных Е-теста во всех 3 случаях, у штаммов со значениями МПК 1 мг/л по Е-тесту это не влияло на отношение $AUC_{0-24}/\text{МПК}$. Но у штаммов со значениями МПК >1 мг/л доверительные интервалы включали значения отношений <400. Таким образом, различия в исходах MRSA-инфицированных больных, леченных ванкомицином, особенно при значениях МПК 1,5–2 мг/л по Е-тесту, можно объяснить вариабельностью, присущей методу микроразведений в бульоне, т. к. они по данному методу соответствуют значениям МПК в пределах 0,84–1,52 мг/л.

* Department of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, CSIC, University of Seville, Seville, Spain.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ МЕТОДОВ ТЕСТИРОВАНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПО МПК ВАНКОМИЦИНА ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ СМЕРТНОСТИ СРЕДИ БОЛЬНЫХ С БАКТЕРИЕМИЕЙ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВЫМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

METHOD-SPECIFIC PERFORMANCE OF VANCOMYCIN MIC SUSCEPTIBILITY TESTS IN PREDICTING MORTALITY OF PATIENTS WITH METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BACTERAEMIA / S.-Y. CHEN, C.-H. LIAO, J.-L. WANG, W.-C. CHIANG, M.-S. LAI, W.-C. CHIE, S.-C. CHANG, P.-R. HSUEN*// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2014; 69: 1: 211–218.

Имеются доказательства того, что инфекции, обусловленные штаммами метициллиноустойчивого *Staphylococcus aureus* (MRSA) с более высокими значениями МПК, но в пределах чувствительности, ассоциируются с плохими исходами. Но работ по исследованию различных методов тестирования чувствительности при прогнозировании исходов лечения MRSA инфекций нет. Настоящее ретроспективное когортное исследование включало 393 больных с MRSA бактериемией. МПК ванкомицина для всех MRSA штаммов были определены одновременно методами разведений в агаре, Е-тестом и с использованием автоматизированных систем MicroScan, VITEK-2 и Phoenix и разделены на штаммы с низкой и высокой МПК при пограничной концентрации ≥ 2 мг/л. Сравнивали существенное и категорическое совпадение между методами тестирования. Специфичность метода

прогнозировать внутрибольничную смертность определяли методом регрессивного логистического анализа при контроле сопутствующих факторов, исходя из клинических данных 310 больных MRSA бактериемией. Методами разведений в агаре, Е-теста, MicroScan, VITEK-2 и Phoenix были расценены как MRSA штаммы с высокой (≥ 2 мг/л) МПК ванкомицина соответственно в 14,2% (56/393), 9,7% (38/393), 28,8% (113/393), 22,6% (89/393) и 3,1% (12/393) случаев. Существенное и категорическое совпадение результатов методов тестирования было в пределах 98,5–100% и 73,8–91,9% случаев, соответственно. Высокие значения МПК, определённые методами разведений в агаре и Е-теста, независимо прогнозировали смертность, когда учитывались сопутствующие факторы [OR, 2,321; 95% ДИ, 1,160–4,641; и OR, 3,121; 95% ДИ, 1,293–7,536, соответственно]. Высокие значения МПК, определённые всеми тремя автоматизированными системами, были не способны прогнозировать смертность. Итак, значения МПК ванкомицина, определённые с помощью методов разведений в агаре и Е-теста, независимо прогнозировали смертность в отличие от автоматизированных систем, у больных MRSA бактериемией. Врачам следует учитывать эту информацию при принятии решений о соответствующем лечении MRSA инфекций.

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

СИЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ СУБ-МПК GSK1322322 И ДРУГИХ ИНГИБИТОРОВ ПЕПТИД ДЕФОРМИЛАЗЫ НА *IN VITRO* РОСТ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

POTENT SUB-MIC EFFECT OF GSK1322322 AND OTHER PEPTIDE DEFORMYLASE INHIBITORS ON *IN VITRO* GROWTH OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* // D. BUTLER, D. CHEN, K. O'DWYER, T. LEWANDOWSKI, K. AUBART, M. ZALACAIN*//ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY JANUARY 2014; 58: 1: 290–296.

Пептид деформилаза (ПДФ), не используемая в клинике в качестве антибиотической мишени, играет важную роль в формировании белка. Ингибиторы ПДФ, следовательно, представляют новый класс антибиотиков с уникальным механизмом действия, которые могут быть альтернативой при лечении инфекций, вызванных лекарственно-устойчивыми патогенами, включая метициллиноустойчивый *Staphylococcus aureus* (MRSA). GSK1322322 — новый ПДФ ингибитор,

находящийся на II стадии клинических испытаний, для лечения инфекций нижних дыхательных путей и кожи. Авторы нашли, что ПДФ ингибиторы при концентрации в 8–32 раза ниже МПК могут предотвращать *in vitro* рост *S. aureus* в течение 6 час. Это явление свойственно ПДФ ингибиторам, ни один испытанный антимикробный препарат с иным механизмом действия не обладал таким сильным и продолжительным действием. Это действие ограничивается *S. aureus*, т. к. ПДФ ингибиторы в суб-МПК концентрациях не подавляли рост *Streptococcus pneumoniae* или *Haemophilus influenzae*. Изучение действия GSK1322322 на рост 100 произвольно отобранных штаммов *S. aureus* показало, что концентрация, равная 1/8 МПК, подавляла рост 91% испытанных штаммов в течение 6 ч, а соответствующие количества моксифлоксацина или линезолида оказывали влияние на рост только 1 и 6% штаммов соответственно. Более того, GSK1322322 в высокой части спектра суб-МПК оказывал более существенное действие, что может усилить клиническую эффективность GSK1322322 в случае тяжёлых инфекций, вызванных *S. aureus* с множественной лекарственной устойчивостью.

*Zala Drug Discovery Consulting, West Chester, Pennsylvania, USA.

**БЕТАЛАКТАМЫ УСИЛИВАЮТ АКТИВНОСТЬ
ВАНКОМИЦИНА ПРИ БАКТЕРИЕМИИ,
ОБУСЛОВЛЕННОЙ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВЫМ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA),
В СРАВНЕНИИ С ОДНИМ ВАНКОМИЦИНОМ.**

**β -LACTAMS ENHANCE VANCOMYCIN ACTIVITY
AGAINST METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS
AUREUS BACTEREMIA COMPARED TO VANCOMYCIN
ALONE / T. J. DILWORTH, O. IBRAHIM, P. HALL,
J. SLIWINSKI, C. WALRAVEN, R.-C. MERCIER* //
ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY
JANUARY 2014; 58: 1: 102–109.**

Ванкомицин (ВАН) часто используют для лечения MRSA бактериемии, несмотря на частые случаи неудачной терапии. В *in vitro* экспериментах комбинация бета-лактамов и ВАН продемонстрировала синергидный эффект в отношении MRSA. Было проверено действие комбинированной терапии бета-лактамы+ВАН (Combo) в сравнении с одним ВАН в ретроспективном когортном исследовании больных с MRSA бактериемией. Эффективность каждого режима лечения оценивали по микробной эрадикации (МЭ) MRSA в гемокультуре после начала лечения. В исследование было включено 80 больных: 50 получали Combo, 30 — ВАН. МЭ была достигнута у 48 (96%) больных в группе Combo у 24

(80%) — в группе ВАН ($p=0,021$). По данным мультивариантной модели большая вероятность достижения высокой МЭ была при лечении Combo (OR, 11,24; 95% ДИ, 1,7–144,3; $p=0,01$). У больных с инфекционным эндокардитом ($n=22$), получавших лечение Combo, МЭ достигала 100% (11/11), тогда как у леченных только ВАН 81,8% (9/11), хотя статистически различия были незначимы ($p=0,20$). Больные с MRSA бактериемией, леченные Combo, имели больше шансов достичь МЭ, чем больные, получавшие только ВАН.

* Department of Pharmacy Practice and Administrative Sciences, University of New Mexico College of Pharmacy, Albuquerque, New Mexico, USA.

**ТЕДИЗОЛИД В ЛЕЧЕНИИ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА:
ХАРАКТЕРИСТИКА *IN VITRO*.**

**TEDIZOLID FOR THE MANAGEMENT OF HUMAN
INFECTIONS: *IN VITRO* CHARACTERISTICS /
J. B. LOCKE*, G. E. ZURENKO, K. JOY SHAW,
K. BARTIZAL // CLINICAL INFECTIOUS DISEASES
2014; 58: SUPPL 1: S35–S42.**

Появление устойчивых к антибиотикам грамположительных патогенных бактерий затрудняет лечение инфекций у человека. Новый оксазолидиноновый антибиотик тедизолид продемонстрировал антимикробную активность, охватывающую широкий круг грамположительных патогенов, превышающую активность линезолида в отношении патогенов дикого типа и устойчивых к лекарствам, включая устойчивые к линезолиду штаммы *Staphylococcus aureus*, несущие мутации в хромосомальных генах, кодирующих 23S рРНК или рибосомальные белки L3 или L4. Селекция штаммов, содержащих такие мутации, происходит гораздо чаще с линезолидом, чем с тедизолидом. Тедизолид также значительно активнее линезолида в отношении штаммов, устойчивых к последнему и обладающих геном *cfr*, способным к горизонтальному переносу. Метилирование A2503 в 23 S рРНК с помощью Cfr метилтрансферазы обеспечивает устойчивость к линезолиду (и другим антибиотикам, мишенью которых является 50 S субъединица рибосомы), но не к тедизолиду, имеющему структурные отличия от линезолида в C5 замещениях А-кольца. Более высокая активность и улучшенный профиль устойчивости создают основу для рассматривания тедизолида в качестве альтернативы линезолиду при лечении тяжёлых инфекций, вызванных грамположительными патогенами.

* Cubist Pharmaceuticals, 6310 Nancy Ridge Dr, Ste 101, San Diego, CA 92121.

**ТЕДИЗОЛИД ФОСФАТ В ЛЕЧЕНИИ ОСТРЫХ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ КОЖИ И КОЖНЫХ
СТРУКТУР: ВЫВОДЫ ПО ЭФФЕКТИВНОСТИ.**

**TEDIZOLID PHOSPHATE FOR THE MANAGEMENT
OF ACUTE BACTERIAL SKIN AND SKIN STRUCTURE
INFECTIONS: EFFICACY SUMMARY / W. O'RIORDAN,
S. GREEN, P. MEHRA, C. DE ANDA, E. FANG,
P. PROKOCIMER* // CLINICAL INFECTIOUS
DISEASES 2014; 58: 1: S43—S50.**

Новый оксазолидиноновый антибиотик тедизолид фосфат находится на последней стадии апробации для лечения острых бактериальных инфекций кожи и кожных структур (ОБИККС). Доклинические и 1 фаза клинических испытаний показали, что суточная доза 200 мг тедизолида фосфата обеспечивает фармакокинетические показатели, дающие оптимальный антимикробный эффект, а рандомизированная 2 фаза испытаний по определению дозирования подтвердила, что тедизолид фосфат может быть препаратом выбора при лечении ОБИККС в дозе 200 мг/сутки, наименьшей эффективной дозе, при курсе лечения 6,4 дня. В первом из 2-х испытаний 3 фазы 6-дневный курс тедизолида фосфата 200 мг/сутки (плюс 4 дня плацебо) был не ниже по эффективности 10-дневного перорального курса линезолида по 600 мг дважды в сутки при оценке в начале лечения (оценка на 48—72 ч) и по окончании (7—14 день после последней дозы лекарства или плацебо). Начальные результаты второго испытания 3 фазы (в/в или пероральная форма) подтверждают, что исследование достигло всех первичных и вторичных показателей и расширило понимание клинической полезности тедизолида фосфата.

*Cubist Pharmaceuticals, 6310 Nancy Ridge Dr, Ste 101, San Diego, CA 92121.

**ТЕДИЗОЛИД ФОСФАТ В ЛЕЧЕНИИ ОСТРЫХ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ КОЖИ И КОЖНЫХ
СТРУКТУР: ВЫВОДЫ ПО БЕЗОПАСНОСТИ.**

**TEDIZOLID PHOSPHATE FOR THE MANAGEMENT
OF ACUTE BACTERIAL SKIN AND SKIN STRUCTURE
INFECTIONS: SAFETY SUMMARY / D. DAS,
P. M. TULKENS, P. MEHRA, E. FANG, P. PROKOCIMER* //**
CLINICAL INFECTIOUS DISEASES 2014; 58: 1: S51—S57.

В исследованиях по изучению эффективности и безопасности тедизолида фосфата, нового антибиотика оксазолидинонового класса, находящегося на последней стадии клинических испытаний, в нескольких доклинических испытаниях на животных моделях и продолжающихся клинических испытаниях оценивали профиль побочных явлений и аспекты безопасности. В начальных исследованиях по дозированию препарата был показан в целом благоприятный профиль побочных явлений, низкий уровень тромбоцитопении, что было подтверждено во 2 и 3 фазах клинических испытаний. Фармакокинетическое моделирование дало основание полагать более слабое взаимодействие с моноаминоксидазой; тестирование на животных и в клинике подтвердило эти предположения. Исследование в популяции больных продемонстрировало сходный и предсказуемый фармакокинетический профиль в разных возрастных группах и при наличии сопутствующих заболеваний, число побочных явлений не превышало их числа в контроле. Благоприятный профиль безопасности делает тедизолид важным новым препаратом выбора при лечении тяжёлых инфекций, обусловленных грамположительными возбудителями, включая метициллиноустойчивый *Staphylococcus aureus*.

* Cubist Pharmaceuticals, 6310 Nancy Ridge Dr, Ste 101, San Diego, CA 92121.

Подготовлено Бондаревой Н. С.

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

Редакция обращает внимание авторов на следующие правила и форму представления рукописей для публикации в журнале «Антибиотики и химиотерапия».

1. Рукописи статей в 2 экз. (вместе с электронной версией текста на диске) с приложением в 2 экз. иллюстраций (в отдельном конверте) направляются по адресу: **113105 Москва, ул. Нагатинская, д. 3а. Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»**. Рукопись должна иметь сопроводительное письмо, подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа. Статья подписывается всеми авторами с указанием ответственного за переписку (Ф.И.О., адрес, телефон).

2. В выходных данных статьи указываются: название, инициалы, фамилии авторов, наименование учреждений, всех авторов, их должности, e-mail.

3. Статья печатается на одной стороне стандартного листа через 1,5–2 интервала при ширине полей слева 3 см.

4. Объём оригинальной статьи (как правило) не должен превышать 12 страниц, включая таблицы и иллюстрации, общее количество иллюстраций — не более 5. Объём обзорной статьи не должен превышать 20 страниц, а список цитируемой литературы — не более 60 названий. Объём заказанных статей устанавливается по договоренности.

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

6. Таблицы должны быть пронумерованы, иметь название, заголовки граф точно соответствовать их содержанию, а цифры в таблицах — цифрам в тексте.

Неофициально принятые сокращения в графах не допускаются. На каждую таблицу в тексте статьи должны быть сноска.

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. На обороте каждого рисунка указывается фамилия первого автора статьи, номер рисунка, обозначается верх рисунка. В тексте статьи обязательны ссылки на рисунок. Рисунки и таблицы не должны дублировать друг друга. Подписи к рисункам делаются на отдельном листе с указанием номера рисунка и его названия. Для графиков и диаграмм отмечается, что дано по осям координат на приведенных кривых и т. п.

8. В формулах должны быть чётко размечены все элементы: строчные (м) и прописные (М) буквы, синим подчеркнуты латинские буквы, красным — греческие (с вынесением разметки на поля), четко выделяются подстрочные и надстрочные индексы; в случае цифр и букв, сходных по написанию (0 — цифра, О — буква), должны быть сделаны соответствующие пометки.

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

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

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

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

13. Цитируемые источники литературы во всех видах публикаций нумеруются в порядке их упоминания в тексте и заключаются в квадратные скобки. В библиографическом описании указываются фамилия, инициалы автора, название статьи, журнала, год, том, номер журнала, номера страниц «от» и «до»; в случае моногра-

фии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, год, количество страниц.

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

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

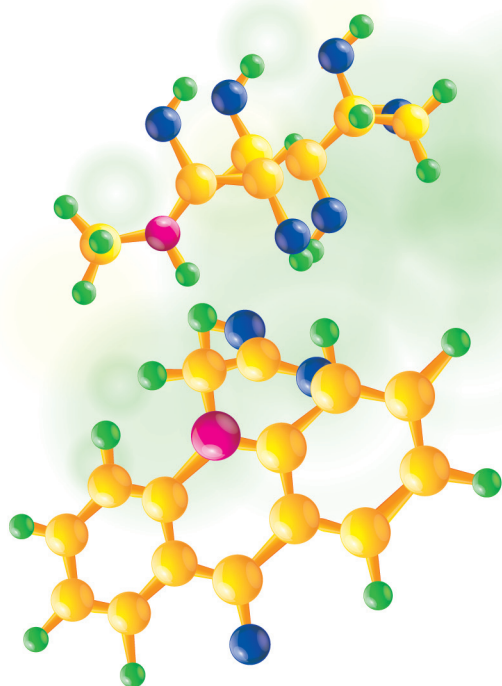
16. Статьи, принятые в журнал, проходят рецензирование. Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

ЦИКЛОФЕРОН®

умное лекарство для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ

БЕЗ РЕЦЕПТА



- ✓ Самый быстрый индуктор интерферона*
- ✓ Обладает прямым противовирусным действием
- ✓ Разрешен детям с 4-х лет и взрослым
- ✓ Сохраняет высокую эффективность даже при частом применении
- ✓ Снижает риск развития осложнений при гриппе и ОРВИ в 9 раз**

таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой 150 мг, N 10, 20, 50

ООО «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ
ФИРМА «ПОЛИСАН»
INFO@POLYSAN.RU WWW.POLYSAN.RU

РОССИЯ, 192102, Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ,
УЛ. САЛОВА, Д. 72, КОР. 2, ЛИТ. А,
ТЕЛ.: +7 (812) 710-82-25
ФАКС: +7 (812) 764-62-84



* Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекулы до их лекарств). - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005.

** Доказано клинически (Исаков В.А., Романцов М.Г. и соавт. Эффективность Циклоферона в терапии и профилактике гриппа и ОРЗ. РМЖ 11, 2011).