

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 60



7-8'2015

Научно-практический журнал

Учредители:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

«Antibiotics and Chemotherapy»
Issued 12 times a year
Since 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а,
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 2015

Типография:

ООО «Новелла»

Дата выхода: 30.09.2015

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 60

7—8'2015

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. Климко Н. Н.
Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.
Проф., д. м. н. Никитин А. В.
Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.
Проф. Руднов В. А.
Проф. Тишков В. Н.
Проф., д. б. н. Фирсов А. А.
Проф., д. м. н. Яковлев С. В.
Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

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

Дмитренко О.А., Анкирская А.С., Любасовская Л.А.,
Ковалишена О.В., Попов Д.А., Гостев В.В., Сидоренко С.В.
Структурный полиморфизм геномных островов,
кодирующих резистентность к бета-лактамам
антибиотикам, у коагулазонегативных стафилококков,
выделенных в стационарах Российской Федерации
Логонова С.Я., Борисевич С.В., Русинов В.Л.,
Уломский Е.Н., Чарушин В.Н.,
Чупахин О.Н., Сорокин П.В.
Изучение лечебной эффективности Триазавирина
в отношении экспериментальной формы
клещевого энцефалита у белых мышей
Автономова А.В., Краснополянская Л.М., Шуктеева М.И.,
Исакова Е.Б., Бухман В.М.
Оценка противоопухолевого действия погруженной
культуры *Ophiocordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*

В помощь практикующему врачу

Коломиец В.М., Абрамов А.В., Рачина Н.В., Рублева Н.В.
Интенсификация этиотропной терапии больных
запущенным туберкулёзом лёгких с использованием
иммуномодуляторов
Мориков Д.Д., Морикова Е.Г., Дворниченко В.В.
Фармакоэкономический анализ использования
гепатопротекторов в лечении лекарственного поражения
печени после химиотерапии лимфомы Ходжкина

Обзоры

Синёва О.Н., Терехова Л.П.
Направленное выделение актиномицетов
редких родов из почвы
Тренин А.С.
Методология поиска новых антибиотиков:
состояние и перспективы
Орлова Т.И., Булгакова В.Г., Полин А.Н.
Вторичные метаболиты морских микроорганизмов.
I. Вторичные метаболиты морских актиномицетов

Original Papers

- 3** Dmitrenko O. A., Ankirskaya A. S., Lyubasovskaya L. A.,
Kovalishena O. V., Popov D. A., Gostev V. V., Sidorenko S. V.
Structural Polymorphism of Genome Islands
Encoding Resistance to Beta-Lactams
in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated at Hospitals
of the Russian Federation
- 11** Loginova S. Ya., Borisevich S. V., Rusinov V. L.,
Ulomsky E. N., Charushin V. N.,
Chupakhin O. N., Sorokin P. V.
Investigation of Therapeutic Efficacy
of Triazavirin Against Experimental
Forest-Spring Encephalitis on Albino Mice
- 14** Avtonomova A. V., Krasnopolkaya L. M., Shuktueva M. I.,
Isakova E. B., Bukhman V. M.
Assessment of Antitumor Effect of Submerged Culture
of *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*

Guidelines For Practitioners

- 18** Kolomiets V. M., Abramov A. V., Rachina N. V., Rubleva N. V.
Immunomodulator Intensification of Etiotropic Therapy
in Patients with Advanced Pulmonary Tuberculosis
- 23** Morikov D. D., Morikova E. G., Dvornichenko V. V.
Pharmacoeconomic Analysis of the Use of Hepatoprotectors
in Management of Drug-Associated Liver Injury Due
to Hodgkin's Lymphoma Chemotherapy

Reviews

- 27** Sineva O. N., Terekhova L. P.
Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Soil
- 34** Trenin A. S.
Methodology of Screening New Antibiotics:
Present Status and Prospects
- 47** Orlova T. I., Bulgakova V. G., Polin A. N.
Secondary Metabolites from Marine Microorganisms.
I. Secondary Metabolites from Marine Actinomycetes.

* 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.

Структурный полиморфизм геномных островов, кодирующих резистентность к бета-лактамам, у коагулазонегативных стафилококков, выделенных в стационарах Российской Федерации

О. А. ДМИТRENKO¹, А. С. АНКИРСКАЯ², Л. А. ЛЮБАСОВСКАЯ²,
О. В. КОВАЛИШЕНА³, Д. А. ПОПОВ⁴, В. В. ГОСТЕВ⁵, С. В. СИДОРЕНКО⁵

¹ Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

² Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

³ Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород

⁴ Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

⁵ Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

Structural Polymorphism of Genome Islands Encoding Resistance to Beta-Lactams in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated at Hospitals of the Russian Federation

O. A. DMITRENKO, A. S. ANKIRSKAYA, L. A. LYUBASOVSKAYA, O. V. KOVALISHENA,
D. A. POPOV, V. V. GOSTEV, S. V. SIDORENKO

N. F. Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow

V. I. Kulakov Scientific Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow

Nizhegorodskaya State Medical Academy, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod

A. N. Bakulev Scientific Centre for Cardiovascular Surgery, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow

Research Institute of Children's Infections, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg

Коагулазонегативные стафилококки (coagulase-negative staphylococci — CoNS) рассматриваются как резервуар мобильных генетических элементов и, в первую очередь, стафилококковой хромосомной кассеты (staphylococcal cassette chromosome *mec* — SCC*mec*), определяющей устойчивость стафилококков к бета-лактамам. Среди 95 изолятов, выделенных в различных регионах Российской Федерации, были SCC*mec* кассеты II, IV, IVa, V, VII и VIII типов. Выявлены также кассеты подтипов CIa, CIb, CIc и CI (комплекс *mec* класса B, и два комплекса рекомбиназ *ccr1* и *ccr2*). Выявлены и другие типы кассет, содержащие комплексы *mec* классов A, C1 и C2 в сочетании с различными генами рекомбиназ. У изолятов *S.epidermidis* преобладали кассеты, несущие комплекс *mec* B, а у изолятов *S.haemolyticus* присутствовали кассеты, несущие комплекс *mec* классов C1 и C2. Из 9 изолятов *S.hominis* — пять несли новый тип кассет: комплекс *mec* класса A в сочетании с комплексом генов рекомбиназ *ccr1*. Не удалось идентифицировать SCC*mec* у представителей *S.capitis* и *S.pasteuri*. У представителей этих видов были выявлены либо комплекс *mec* (*S.pasteuri* — 1 изолят), либо комплексы рекомбиназ *S.capitis* (2 изолята). Выявленные у CoNS варианты SCC*mec* могут служить источником для формирования новых генетических линий метициллинорезистентных *S.aureus* (MRSA).

Ключевые слова: коагулазонегативные стафилококки, устойчивость к метициллину, стафилококковая хромосомная кассета SCC*mec*.

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are considered as a reservoir of mobile genetic elements and first of all of the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), defining staphylococci resistance to beta-lactams. Types II, IV, IVa, V, VII and VIII SCC*mec* were detected among 95 staphylococcal strains isolated in different regions of the Russian Federation. Subtypes CIa, CIb, CIc and CI SCC*mec* were also identified (class B *mec* complex and two complexes of *ccr1* and *ccr2* genes recombinases). Some other cassette types carrying A, C1 and C2 classes of the *mec* complexes in combination with various recombinase genes were detected. The *S.epidermidis* isolates mainly formed cassettes carrying *mec* complex B, while the *S.haemolyticus* isolates had cassettes carrying classes C1 and C2 *mec* complex. Out of 9 isolates of *S.hominis* 5 isolates carried a new type cassette: class A *mec* complex in combination with the complex of the recombinase *ccr1* genes. SCC*mec* was not identified in *S.capitis* and *S.pasteuri*. Their representatives carried either *mec* complex (1 isolate of *S.pasteuri*) or the recombinase complexes (2 isolates of *S.capitis*). The detected SCC*mec* variants in CoNS could be a source of emergence of new genetic lines of MRSA.

Key words: coagulase-negative staphylococci, methicillin resistance, staphylococcal cassette chromosome *mec*.

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.
НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи

Введение

Бактерии рода *Staphylococcus* насчитывают более 50 видов, из которых около 20 выделяют из различных локусов организма человека. Для практических целей стафилококки подразделяют по признаку продуцирования фермента коагулазы на коагулазоположительные и коагулазоотрицательные (coagulase-negative staphylococci — CoNS). Продукция коагулазы исторически рассматривается как признак вирулентности стафилококков [1]. Среди стафилококков, наиболее характерных для человека, коагулазу продуцирует только *Staphylococcus aureus*. Коагулазу также продуцируют редко встречающиеся у человека виды — *S.delphini*, *S.hyicus*, *S.intermedius*, *S.lutrae*, *S.schleiferi* subsp. *coagulans*. CoNS в отличие от *S.aureus* являются относительно мало патогенными бактериями. Их роль резко возрастает по мере внедрения в медицинскую практику инвазивных технологий и увеличения числа иммунокомпрометированных пациентов. Патогенез инфекций, вызываемых CoNS, во многом определяется способностью этих бактерий к образованию биоплёнок [2]. Среди этой группы микроорганизмов особенно значимая роль в патологии человека принадлежит *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.saprophyticus*, *S.warneri*, *S.capitis*, *S.lugdunensis*.

На сегодняшний день CoNS — это типичные нозокомиальные патогены, вызывающие катетер-ассоциированные инфекции кровотока, инфекции внутрисосудистых устройств и различных имплантатов, эндокардиты искусственных и естественных клапанов, инфекции кожи и мягких тканей. Для молодых женщин характерны инфекции мочевыводящих путей, вызываемые *S.saprophyticus* [3, 4]. Экономические потери, связанные с лечением катетер-ассоциированной бактериемии (основной нозологической формы, вызываемой CoNS) только в США составляют более 2 млрд долларов ежегодно [5]. В группу риска развития инфекций, вызванных CoNS, входят пациенты ОРИТ, новорождённые с низкой массой тела, лица, перенёвшие пересадку костного мозга, множественные травмы и др. [3, 6, 7].

Трудности и значительная стоимость лечения инфекций, вызываемых CoNS, обусловлены высокой частотой устойчивости к метициллину/оксациллину, являющейся маркером устойчивости ко всем бета-лактамам антибиотикам. Устойчивость к метициллину была впервые описана у *S.aureus* в 1961 г., а вскоре и у *S.epidermidis* [8]. Указанный вид устойчивости опосредован низкоаффинным пенициллинсвязывающим белком ПСБ2а, кодируемым геном *mecA*. К настоящему времени известны несколько групп гомологов гена *mecA* (*mecA*, *mecA1*, *mecA2*, *mecB*, *mecC*), встречающихся как у стафилококков, так и у некоторых родственных бактерий [9]. Ген *mecA* и большинст-

во его гомологов обычно расположены на мобильном генетическом элементе, получившем название стафилококковой хромосомной кассеты *mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec* — SCC*mec*), являющейся геномным островом вариабельных размеров (21—67 тыс. по.).

В генетическом строении SCC*mec* выделяют: *mec*-комплекс, *ccr*-комплекс и J-регионы. В основе типовой классификации лежат различия в строении этих структурных элементов. На сегодняшний день описано 11 основных типов SCC*mec* и множество субтипов, различающихся по генетическому строению. Структура SCC*mec* у CoNS отличается значительным разнообразием и часто не укладывается в схемы типирования, принятые для *S.aureus*. Описывают новые варианты *mec*- и *ccr*-комплексов, а также их новые комбинации, ряд таких вариантов получил временные названия, их структура нуждается в дальнейшем уточнении. Считается, что CoNS являются резервуаром разнообразия мобильных генетических элементов для *S.aureus* [10].

Учитывая ведущую роль SCC*mec* в эволюции антибиотикорезистентности и формировании новых генетических линий не только CoNS, но и *S.aureus*, изучение структуры этого генетического элемента представляется важной теоретической и практической задачей, решению которой и посвящена настоящая статья.

Материал и методы

В исследование включены 95 изолятов CoNS, выделенных в родовспомогательных учреждениях Москвы и Нижнего Новгорода, а также в Центре сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева. Для оценки чувствительности к антибиотикам использовали метод серийных разведений в агаре [11]. Интерпретацию результатов проводили согласно критериям CLSI [12]. ДНК выделяли по методике, описанной ранее [13]. Дифференциацию SCC*mec* элементов проводили на основании идентификации комплексов *mec*, комплексов генов *ccr* и анализа генетической области J1 с использованием мультиплексных праймеров и условий амплификации, предложенных в работе [14] и рекомендованных международной рабочей группой (IWG-SCC*mec* — International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements — <http://www.sccmec.org>). Для идентификации комплекса *mec* класса C1 использовали дополнительный праймер, предложенный в работе [15]. С целью возможной идентификации недавно охарактеризованной SCC*mec* XI типа, несущей гомолог гена *mecA* использовали праймеры и условия ПЦР, описанные [16].

Все праймеры были синтезированы фирмой «Евроген» (Москва, Россия). ПЦР-амплификацию проводили в объёме 25 мкл реакционной смеси, которая включала: амплификационный буфер 2,5 мкл (10×) с pH 8,6, 2,5 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (смесь dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 0,4 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл) фирмы «Силекс» (Москва, Россия); по 1 мкл каждого праймера и 1 мкл ДНК — матрицы; деионизированную воду добавляли до конечного объёма 25 мкл. Концентрация праймеров и количество MgCl₂ могло изменяться в зависимости от свойств праймеров. Амплификацию ДНК осуществляли на термоциклере «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Москва, Россия). Визуализацию продуктов реакции осуществля-

Таблица 1. Видовой состав и источники выделения CoNS

Вид CoNS	Количество изолятов <i>n</i> (%)	Образцы биологического материала, <i>n</i>							Окружающая среда
		кровь	конъюнктив	пупочная рана	трахея	моча	ткань лёгких при аутопсии	другое	
<i>S.epidermidis</i>	46 (48,4)	20	17	5		2	1	1	
<i>S.haemolyticus</i>	27 (28,4)	13	4	5	3			2	
<i>S.warneri</i>	9 (9,4)		5	1	1		1		1
<i>S.hominis</i>	9 (9,4)	5	3						1
<i>S.capitis</i>	2 (2,1)								2
<i>S.pasteuri</i>	2 (2,1)		1						1
Всего:	95 (100)	38	30	11	4	2	2	3	5

ли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с добавлением этидиум-бромид.

Секвенирование отдельных амплифицированных фрагментов стафилококковых хромосомных кассет после выделения из геля и последующей очистки с использованием набора GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Великобритания) выполнили в Центре коллективного пользования «Геном». Результаты секвенирования анализировали с использованием программы BLASTN Интернет-ресурса NCBI.

В качестве контрольных использовали штаммы EMRSA-1 (SCCmecIII: комплекс класс A, *ccr3*), EMRSA-2 (SCCmec IV: комплекс *mec* класс B, *ccr2*), EMRSA-3 (комплекс *mec* класс B, *ccr1*), полученные из Центральной лаборатории общественного здравоохранения г. Лондона, а так же *S.aureus* ATCC 25923 (Oxa²).

Результаты исследований

Характеристика изолятов CoNS. По результатам ранее выполненного секвенирования гена *tuf* изоляты CoNS относились к 4 видам: *S.epidermidis* — 48,4 %, *S.haemolyticus* — 28,4,2%, *S.hominis* — 9,4%, *S.warneri* — 9,2, *S.pasteuri* — 2,1%, *S.capitis* — 2,1%. Как видно из данных, представленных в табл. 1, чаще всего выделяли *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*, эти виды были выделены из разнообразных образцов биологического материала. Именно эти виды, а также *S.hominis* были изолированы от пациентов с катер-ассоциированной бактериемией. Наибольшим видовым разнообразием отличались изоляты, выделенные с конъюнктивы, среди них идентифицированы представители пяти видов, доминировали *S.epidermidis* и *S.warneri*. Представители двух последних видов, а также *S.haemolyticus* были идентифицированы в посевах отделяемого из пупочных ран. Из ткани лёгкого погибшего новорождённого были выделены изоляты, принадлежащие к видам *S.epidermidis* и *S.warneri*. Представителей видов *S.warneri*, *S.hominis*, *S.capitis* и *S.pasteuri* обнаруживали в смывах с поверхности предметов больничной обстановки.

Идентификация комплексов *mec*. Специфические продукты амплификации при использовании соответствующих праймеров образовали комплексы *mec* классов A, B, C1, C2, которые были выявлены у 13, 38, 26 и 5 изолятов соответственно. При идентификации комплекса *mec* класса C1, специфичного для кассет VII и X типов, образовалось два типа ампликонов. У изолята *S.epider-*

midis MCP 211 сформировался ампликон размером более 1000 н.п., тогда как у изолятов *S.haemolyticus* MCP455, MCP708, 708, 784 и др. образовались ампликоны размером около 300 н.п. В связи с этим определяли нуклеотидную последовательность двух типов ампликонов. Так, была выявлена 100% гомология короткого с последовательностью фрагментов гена *mecA* и транспозона *tn431* у штамма JCSC6945, представленного как типичный для идентификации комплекса *mec* класса C1 у SCCmec X. Определение нуклеотидной последовательности амплифицированного фрагмента размером более 1500 н.п. и последующий анализ результатов с использованием программы BLASTN показали, что исследуемая область имеет 99% гомологию с регуляторной областью *mecR1* гена *mecA* кластера геномов *S.aureus* ST228, входящих в четвертую геномную группу GenBank. Таким образом, именно ампликон размером 300 н.п. оказался специфичным для области *mec* C1. У 10 изолятов идентифицировать комплекс *mec* не удалось.

Идентификация комплексов *ccr*. Были идентифицированы комплексы *ccr1* (*n*=41), *ccr2* (*n*=44), *ccr4* (*n*=3) *ccr5* (*n*=7). У 33 изолятов не удалось идентифицировать комплекс генов рекомбиназ. Среди этих изолятов преобладали представители вида *S.haemolyticus* (*n*=19). У 32 изолятов *S.epidermidis* и 2 изолятов *S.warneri* были обнаружены два комплекса генов рекомбиназ *ccr1* и *ccr2*. Комплексы генов рекомбиназ *ccr2* и *ccr5* были выявлены у изолята *S.haemolyticus* MCV14, а *ccr1* и *ccr5* — у изолята *S.hominis* MCV22. У изолята N.N.804 были обнаружены 3 комплекса генов рекомбиназ: *ccr1*, *ccr2* и *ccr5*.

Выявление структурных особенностей генетической области J1. 27 изолятов несли вариант J1a, 3 — содержали вариант J1b и 2 изолята имели вариант J1c. Ни у одного из изолятов не обнаружен вариант J1d.

Идентификация кассет *mec*. Как видно из представленных в табл. 2 данных, на основании идентификации комплексов *mec* и комплексов рекомбиназ, а также генетической области J1a были идентифицированы следующие типы кассет: SCCmec II (*n*=1); IV (*n*=2); IVa (*n*=2), V (*n*=3),

Таблица 2. Результаты идентификации кассет *mec*

Тип SCC <i>mec</i>	Класс <i>mec</i> комплекса	Комплекс <i>ccr</i>	Вид						Всего
			<i>S.epidermidis</i> (n=46)	<i>S.haemolyticus</i> (n=27)	<i>S.warneri</i> (n=9)	<i>S.hominis</i> (n=9)	<i>S.pasteuri</i> (n=2)	<i>S.capitis</i> (n=2)	
II	A	2	1	—	—	—	—	—	1
IV	B	2	1	—	1	—	—	—	2
IVa	B	2	2	—	—	—	—	—	2
V	C2	5	—	3	—	—	—	—	3
VII	C1	5	1	1	—	—	—	—	2
VIII	A	4	2	1	—	—	—	—	3
CI*	B	1, 2	2	—	2	—	—	—	4
CIa	B	1, 2	25	—	—	—	—	—	25
CIb	B	1, 2	3	—	—	—	—	—	3
CIc	B	1, 2	2	—	—	—	—	—	2
N1	A	1	—	—	—	5	—	—	5
N2	A	5	1	—	—	—	—	—	1
N3	C1	2	—	1	—	—	—	—	1
N4	C1	2, 5	—	1	—	—	—	—	1
N5	C2	1, 2, 5	1	—	—	—	—	—	1
N6	A, C1	1, 5	—	—	—	1	—	—	1
н/и	A	н/и	—	—	—	2	—	—	2
н/и	C1	н/и	—	19	—	—	1	—	19
н/и	C2	н/и	—	1	—	—	—	—	1
н/и	н/и	н/и	—	—	2 <i>mecA</i> +, 4 <i>mecA</i> -	1 <i>mecA</i> -	1 <i>mecA</i> -	—	8
н/и	н/и	2	—	—	—	—	—	2	2

Примечание. Н/и — не идентифицированы.

VII (*n*=3), VIII (*n*=3). Идентифицировано несколько новых типов кассет, не охарактеризованных ранее и отсутствующих на сайте IWG-SCC. Это — прежде всего композитная кассета, содержащая комплекс *mec* класса В и два комплекса рекомбиназ *ccr1* и *ccr2*. На основании структурных особенностей области J1 выявлены 4 подтипа кассеты: SCC*mec*-CIa (25); SCC*mec*-CIb (3), SCC*mec*-CIc (2), а также SCC*mec*-CI (4), у которой не удалось идентифицировать область J1a. Выявлены и другие типы кассет, содержащие комплексы *mec* классов А, C1 и C2 в сочетании с различными генами рекомбиназ, а именно: N1 (комплекс *mec* класса А, *ccr1*); N2 (комплекс *mec* класса А, *ccr5*); N3 (комплекс *mec* класса C1, *ccr2*); N4 (комплекс *mec* класса C1, *ccr2*, *ccr5*); N5 (комплекс *mec* класса C2, *ccr1*, 2, 5), а также N6 (комплексы *mec* классов А, C1 и комплексы рекомбиназ *ccr1*, *ccr5*). Кроме того, у изолятов *S.haemolyticus*, вызвавших гнойно-воспалительные заболевания новорождённых и случаи катетер-ассоциированной бактериемии в Центре сердечно-сосудистой хирургии, обнаружен только комплекс *mec* класса C1, специфичный для кассет X типа, но комплекс генов рекомбиназ выявить не удалось.

Распределение типов кассет у различных видов.

У *S.epidermidis* выявлены кассеты шести типов: SCC*mec* II (комплекс *mec* класса А, *ccr2*), SCC*mec* IV (комплекс *mec* класса В, *ccr2*), композитный тип SCC*mec*-CI, (комплекс *mec* класса В и два комплекса генов рекомбиназ: тип 1 и тип 2), SCC*mec*

VIII (комплекс *mec* класса А, *ccr4*). Один изолят содержал новый, ранее не охарактеризованный тип кассет, у которого комплекс *mec* класса А сочетался с рекомбиназой, кодируемой *ccr5* (*ccrC*). Ещё у одного изолята был обнаружен комплекс *mec* класса C2 и геном рекомбиназы *ccr5*, специфичные для SCC*mec* V, однако этот изолят нёс дополнительные гены рекомбиназ *ccr1* и *ccr2*. Доминировал композитный тип — SCC*mec*-CIa.

В отличие от изолятов *S.epidermidis*, у которых преобладали кассеты, несущие комплекс *mec* В, у изолятов *S.haemolyticus* присутствовали кассеты, несущие комплекс *mec* классов C1 и C2. При этом у одного изолята комплекс *mec* C1 сочетался с генами рекомбиназ *ccr1*, образуя кассету VII типа, у двух других изолятов данный комплекс сочетался с комплексами рекомбиназ *ccr2* и *ccr2* + *ccr5*, образуя два новых типа кассет. У 19 изолятов идентифицировать комплекс *ccr* нам не удалось. Согласно данным [6] комплекс *mec* класса C1 может сочетаться с комплексами рекомбиназ *ccr5* или *ccr7* (комплекс образован рекомбиназами с аллотипами *ccrA1* и *ccrB6*). У трёх изолятов *S.haemolyticus* была обнаружена кассета тип V, несущая комплекс *mec* класса C2 и комплекс рекомбиназ *ccr5*. Ещё у одного изолята была выявлена кассета тип VIII. У 2 изолятов *S.warneri* была обнаружена SCC*mec*-CI, ещё у одного — SCC*mec* тип IV, однако у 6 изолятов выявить SCC*mec* нам не удалось. Два из них несли ген *mecA*. У оставшихся 4 изолятов ни ген *mecA*, ни ген *mecC* выявить не удалось.

Из 9 изолятов *S. hominis* — 5 несли новый тип кассет: комплекс *mec* класса А в сочетании с комплексом генов рекомбиназ *ccr1*. Еще у одного изолята, помимо данного типа кассет, были выявлены структурные элементы, характерные для кассеты типа VII. У двух изолятов удалось выявить только комплекс *mec* класса А, однако гены рекомбиназ идентифицировать не удалось. Не удалось идентифицировать и SCC*mec* у представителей *S. capitis* и *S. pasteurii*. У представителей этих видов были выявлены либо комплекс *mec* (*S. pasteurii* — 1 изолят), либо комплексы рекомбиназ *S. capitis* (2 изолята).

Филогенетические связи между кассетами различных типов. Кассета *mec* IV типа (комплекс *mec* класса В в сочетании с комплексом рекомбиназ *ccr2*) и композитная SCC*mec* -CI, несущая комплекс *mec* В и два комплекса генов рекомбиназ *ccr1* и *ccr2*, были идентифицированы в геноме изолятов, принадлежащих двум видам: *S. epidermidis* и *S. warneri*. Подобный рекомбинантный тип кассет был обнаружен нами ранее [17] в геноме изолятов *S. aureus*, принадлежащих эпидемическому штамму REMRSA-2, циркулирующему в стационарах нескольких регионов РФ. Данный тип кассет не описан у метициллинорезистентных штаммов *S. aureus* (MRSA), циркулирующих в других регионах мира. Согласно современной классификации, комплекс *mec* класса В несут кассеты либо первого типа, у которых они сочетаются с генами рекомбиназ типа 1, либо кассеты четвертого типа, когда они сочетаются с генами рекомбиназ типа 2. Очевидно, что рекомбинантный тип кассет мог сформироваться либо на основе кассеты типа I, либо на основе кассеты типа IV. Поскольку у тестируемых изолятов *S. epidermidis* выявили кассету типа IV, была высказана рабочая гипотеза, что рекомбинантная кассета, несущая два комплекса генов *ccr1* и *ccr2*, сформировалась именно на основе кассеты типа IV путём приобретения второго комплекса генов рекомбиназ. Для дифференциации возможного наличия фрагментов кассет типа I или типа IV дополнительно исследовали область J1 в структуре кассет *mec*. Эта область несёт набор генов, продукты которых наименее изучены в настоящее время. У кассет типа IVa выделяют несколько вариантов структурного компонента J1: J1a-h [14, 18].

Проведённые исследования показали, что подавляющее большинство изолятов *S. epidermidis*, несущих кассету тип IV, обладают областью J1a. Именно этот вариант области J1 был обнаружен у большинства изолятов *S. epidermidis*, несущих и композитный тип кассет. Для подтверждения полученных данных о генетическом родстве кассеты типа IV и композитной кассеты исследовали и другие области кассет, в частности генные комплексы, кодирующие рекомбиназы. Известно, что ответствен-

ными за мобильность кассет типа IV являются гены рекомбиназ тип 2 (*ccr2*). В связи с этим структурный полиморфизм ампликонов протяжённостью более 900 н. п., образовавшихся при использовании праймеров, позволяющих идентифицировать комплекс генов *ccr2* как у изолятов, несущих SCC*mec* IV (изолят *S. epidermidis* Мср754), так и композитный тип кассет (*S. epidermidis* Мср 557, Мсв 35), исследовали методом секвенирования. Степень гомологии секвенированных фрагментов и подобных областей у референс-штаммов *S. aureus* Mu 50 и N315 колебалась в пределах 94,7–95,8%, при этом гомология между собой трёх ампликонов составила 95,4% (при попарном сравнении она колебалась в пределах 97–97,7%). Подобным образом сравнили ампликоны, образовавшиеся при идентификации комплекса генов *ccr1* у изолятов *S. epidermidis* Мср 557 и Мсв 35. Идентичность этой области у тестируемых изолятов составила 93%, при этом сходство с референс-штаммом NCTC10442 не превышало 70,4%.

Согласно критериям (www.sccmec.org) полученные результаты позволяют говорить об идентификации нового аллотида генов рекомбиназ *ccr1*. В связи с этим последовательность нуклеотидов комплекса *ccr2* у изолята *S. epidermidis* Мср 557 (SCC*mec* — композитный тип) сравнили с таковой же у изолята *S. aureus* 712 *spa* типа t-008, относящегося к эпидемическому штамму REMRSA-2. Гомология тестируемых фрагментов составила 97,4%, что доказывает их идентичность. Гомология амплифицированного фрагмента *ccr1* изолята *S. aureus* 712 составила 96,6 и 97,8% для изолятов 557 и 35 соответственно, несущих композитный тип кассет.

Следовательно, как при использовании ПЦР-анализа, так и определения нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов генов рекомбиназ был получен ряд данных, подтверждающих гипотезу о формировании композитной кассеты на основе кассеты типа IV, а также о сходстве строения композитных кассет у *S. epidermidis* и *S. aureus*. Кроме того, проанализировали особенности структуры генов комплекса *ccr* у одного из 6 изолятов *S. hominis*, несущих новый тип SCC*mec*, представленный комплексом *mec* класса А и комплексом *ccr1*. Гомология с комплексом *ccr1* референс-штамма NCTC10442 составила 96,1%, что свидетельствует о том, что данный тип кассет возник в результате замены комплекса *mec* класса В у кассеты тип I на комплекс *mec* класса А. Данные секвенирования занесены в GenBank. Регистрационные номера KF 042470, KF042471, KF154274, KF 279295, KF056792, KF056793, KF154274, KF154275.

Обсуждение результатов

Проведённые исследования позволили выявить значительное разнообразие SCC*mec* у изученной выборки CoNS. Идентифицированы кас-

сеты пяти типов: SCCmec II (комплекс *mec* класса A, *ccr2*), IV (комплекс *mec* класса B, *ccr2*), V (комплекс *mec* класса C2, *ccr5*), VII (комплекс *mec* класса C1, *ccr5*), VIII (комплекс *mec* класса A, *ccr4*), а также композитный тип кассет, несущий комплекс *mec* класса B и два комплекса генов *ccr* типов 1 и 2. Кассеты IV, V, VII, VIII типов, а также композитный тип кассет выявлены в геноме изолятов, принадлежащих различным видам CoNS, что свидетельствует о способности этих типов кассет к межвидовой передаче. У наиболее распространённого представителя группы CoNS — *S.epidermidis* выявлено значительное разнообразие SCCmec, для этих бактерий также характерно одновременное наличие нескольких типов рекомбиназ. Принципиально сходные данные были получены и в других работах. Так, в коллекции метициллинорезистентных CoNS, выделенных от носителей в четырёх странах мира, 34% изолятов несли несколько комплексов генов рекомбиназ, при этом комплексы *mec* классов A, B, и C сочетались с различными комплексами рекомбиназ, среди которых преобладали *ccr2*, *ccr4* и *ccrC*. [19]; среди клинических изолятов *S.epidermidis*, выделенных из крови новорождённых, было обнаружено 13 различных комбинаций SCCmec с комплексами генов рекомбиназ, при этом, как и в настоящем исследовании, среди изолятов преобладал композитный тип кассет, несущий комплекс *mec* класса B в сочетании с комплексами генов рекомбиназ *ccr1* и *ccr2* [20]. Вероятно, что наличие нескольких типов рекомбиназ в геноме CoNS и создает предпосылки для формирования новых типов кассет.

Проведённые исследования позволили выявить филогенетические связи между кассетами различных типов, а также кассетами, обнаруженными у представителей разных видов. На основе анализа генетической области J1a выявлено структурное сходство композитной кассеты *mec* с кассетами SCCmec типа IVa, присутствующих у изолятов *S.epidermidis*. Выявлены новые ранее не описанные типы кассет: комплекс *mec* класса A + *ccr5*; комплекс *mec* класса A + *ccr1*; комплекс *mec* класса C1 + *ccr2*; комплекс *mec* класса C1 + *ccr2*, *ccr5*; комплекс *mec* класса C2 + *ccr1*, 2, 5. Кроме того, у изолятов *S.haemolyticus*, вызвавших вспышки внутрибольничных инфекций, возможно также обнаружен новый тип кассет, несущий комплекс *mec* класса C1, специфичный для кассет X типа, но неизвестный комплекс генов рекомбиназ. Однако не исключена и другая альтернатива. У данных изолятов ген *mecA* присутствует в хромосоме не в составе какой-либо кассеты, а в структуре транспозона, как у штамма *S.haemolyticus* WCH1 [21].

Определённый интерес представляет отсутствие у изученных CoNS кассет SCCmec III типа,

указанный тип кассет характерен для одного из двух доминирующих в России клональных комплексов MRSA — CC239 [22–24]. Вполне вероятно, что эффективный горизонтальный генетический обмен между отдельными видами стафилококков может иметь и определённые ограничения, которые могут опосредоваться различными механизмами, например системами рестрикции — модификации и CRISPR [25].

Впервые у изолятов *S.epidermidis* и *S.haemolyticus*, выделенных в стационарах РФ, идентифицирована SCCmec типа VIII. Ранее этот тип кассет был обнаружен у эпидемического штамма MRSA ST8 (*spa* t-008), распространившегося в стационарах Канады [26]. Следует отметить, генетическая линия является доминирующей в России MRSA ST8, однако в подавляющем большинстве случаев для неё характерна SCCmec кассета IV типа [22, 24].

Получены данные об особенностях структуры нового не охарактеризованного ранее типа SCCmec (комплекс *mec* класса A, *ccr1*), идентифицированного у представителей вида *S.hominis*, достаточно редко вызывающего заболевания у человека. Проведённый анализ нуклеотидной последовательности генов комплекса *ccr1* у *S.hominis* свидетельствует о том, что данный тип кассет возник в результате замены комплекса *mec* класса B у кассеты I типа на комплекс *mec* класса A. Приобретение комплекса *mec* класса A вносит существенный вклад в формирование патогенного потенциала CoNS, поскольку, как недавно было показано, в составе этой генетической области имеется ген, кодирующий синтез пептида, получившего название фенолорастворимого модулина типа альфа, который обладает цитолитической активностью в отношении нейтрофилов и отсутствует в ядерной части генома CoNS [27]. Выявлено распространение клона *S.hominis*, содержащего новый тип SCCmec в стационарах г. Москвы, вызвавшего несколько случаев развития катетер-ассоциированной бактериемии.

У нескольких изолятов CoNS, несмотря на наличие гена *mecA*, были идентифицированы только отдельные компоненты кассет: либо комплекс(ы) генов рекомбиназ, либо комплекс *mec*, однако идентифицировать тип кассет не удалось. Возможно, они также несут ещё не описанные варианты SCCmec. У отдельных изолятов *S.epidermidis*, *S.warneri*, *S.pasteuri* и *S.capitis*, демонстрировавших устойчивость к оксацилину, не удалось обнаружить ни ген *mecA*, ни его гомологи. Более детальное изучение таких изолятов позволит выявить новые механизмы резистентности у стафилококков к бета-лактамам антибиотикам.

Не выявлено связи между присутствием определённого типа SCCmec и развитием тех или иных форм внутрибольничной инфекции. Вместе с тем было установлено, что изоляты CoNS различных

видов, даже выделенные в одном стационаре, несут, как правило, разные типы SCCmec, что свидетельствует о том, что их формирование происходило в различных условиях. Так, у изолятов *S. epidermidis* преобладал тип SCCmec, несущий комплекс mec класса B (SCCmec композитная и SCCmec IV типа); у изолятов *S. haemolyticus* кассеты, несущие комплекс mec классов C1 и C2 в сочетании с различными генами рекомбиназ, у изолятов *S. hominis* — доминировал новый тип кассет, представленный комплексом mec класса A и комплексом ccr1. Подобная закономерность была отмечена и в ряде других исследований [19, 28].

Таким образом, структурное разнообразие SCCmec, выявленное при исследовании изолятов

CoNS, выделенных в стационарах Российской Федерации, свидетельствует о высокой степени нестабильности этих генетических элементов, их способности к различным перестройкам. Полученные данные подтверждают гипотезу о ведущей роли CoNS как резервуара SCCmec для всего рода *Staphylococcus* [29]. Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности включения SCCmec типирования CoNS в систему эпидемиологического надзора за возбудителями внутрибольничных инфекций в стационарах РФ.

Уведомление: Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №15-15-00185)

ЛИТЕРАТУРА

1. Fairbrother R. W. Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. J Pathol Bacteriol 1940; 50: 1: 83–88.
2. Becker K., Heilmann C., Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 2014; 27: 4: 870–926.
3. Piette A., Verschaegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Vet Microbiol 2009; 134: 1–2: 45–54.
4. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* — the ‘accidental’ pathogen. Nat Rev Microbiol 2009; 7: 8: 555–567.
5. Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Semin Immunopathol 2012; 34: 2: 201–214.
6. Krediet T.G., Mascini E.M., van Rooij E., Vlooswijk J., Paauw A., Gerards L.J., Fleer A. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. J Clin Microbiol 2004; 42: 3: 992–995.
7. Cheung G.Y., Otto M. Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children. Curr Opin Infect Dis 2010; 23: 3: 208–216.
8. Kjellander J.O., Klein J.O., Finland M. In Vitro Activity of Penicillins against *Staphylococcus albus*. Proc Soc Exp Biol Med 1963; 113: 1023–1031.
9. Ito T., Hiramatsu K., Tomasz A., de Lencastre H., Perreten V., Holden M.T.G., Coleman D.C., Goering R., Giffard P.M., Skov R.L. et al. Guidelines for reporting novel mecA gene homologues. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2012; 56: 10: 4997–4999.
10. Shore A.C., Coleman D.C. Staphylococcal cassette chromosome mec: recent advances and new insights. Int J Med Microbiol 2013; 303: 6–7: 350–359.
11. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890-04.2004. / Metodicheskie ukazaniya po opredeleniju chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890-04.2004. [in Russian]
12. CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. In. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
13. Воронина О.Л., Кунда М.С., Дмитренко О.А., Любасовская Л.А., Ковалишенина О.В., Попов Д.А. Оценка видового разнообразия коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных в стационарах Российской Федерации в 2009–2010 гг. Журн микробиол эпидем иммунол 2011; 1: 3–8. / Voronina O.L., Kunda M.S., Dmitrenko O.A., Ljubasovskaja L.A., Kovalishena O.V., Popov D.A. Ocenka vidovogo raznoobrazija koagulazootricatel'nyh stafilocokkov, vydelennyh v stacionarah Rossijskoj Federacii v 2009–2010 gg. Zhurn mikrobiol jepidem immunol 2011; 1: 3–8. [in Russian]
14. Kondo Y., Ito T., Ma X.X., Watanabe S., Kreiswirth B.N., Etienne J., Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1: 264–274.
15. Ruppe E., Barbier F., Mesli Y., Maiga A., Cojocar R., Benkhalfat M., Benchouk S., Hassaine H., Maiga I., Diallo A. et al. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. Antimicrobial Agents Chemother 2009; 53: 2: 442–449.
16. Stegger M., Andersen P.S., Kearns A., Pichon B., Holmes M.A., Edwards G., Laurent F., Teale C., Skov R., Larsen A.R. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either mecA or the new mecA homologue mecA (LGA251). Clin Microbiol Infect 2012; 18: 4: 395–400.
17. Дмитренко О.А. Молекулярно-генетические аспекты эпидемиологии внутрибольничных инфекций, вызванных представителями вида *Staphylococcus aureus*, устойчивыми к метициллину/оксациллину. М.: 2008. / Dmitrenko O.A. Molekularno-geneticheskie aspekty jepidemiologii vnutribol'nicnyh infekcij, vyzvannyh predstaviteljami vida *Staphylococcus aureus*, ustojchivymi k meticillinu/oksacillinu. M.: 2008. [in Russian]
18. Milheirico C., Oliveira D.C., de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: ‘SCCmec IV multiplex’. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 1: 42–48.
19. Ruppe E., Barbier F., Mesli Y., Maiga A., Cojocar R., Benkhalfat M., Benchouk S., Hassaine H., Maiga I., Diallo A. et al. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 2: 442–449.
20. Svensson K., Hellmark B., Soderquist B. Characterization of SCCmec elements in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures from neonates during three decades. APMIS 2011; 119: 12: 885–893.
21. Zong Z. Characterization of a complex context containing mecA but lacking genes encoding cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus haemolyticus*. BMC Microbiol 2013; 13: 64.
22. Гостев В.В. Метициллинорезистентные золотистые стафилококки: проблема распространения в мире и России. Фарматека 2015; 6: 30–38. / Gostev V.V. Meticillinorezistentnye zolotistye stafilocokki: problema rasprostraneniya v mire i Rossii. Farmateka 2015; 6: 30–38. [in Russian]
23. Дмитренко О.А., Шагинян И.А., Прохоров В.Я., Матвеев С.М., Аляпкина Ю.С., Ванюшева О.В., Шилов И.А., Лунин В.Г. Исследование полиморфизма коагулазного гена методом секвенирования у метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в стационарах различных регионов России и Беларуси. Журн микробиол, эпидемиол иммунобиол 2005; 3: 27–32. / Dmitrenko O.A., Shaginjan I.A., Prohorov V.Ja., Matveev S.M., Aljapkina Ju.S., Vanjusheva O.V., Shilov I.A., Lunin V.G. Issledovanie polimorfizma koagulaznogo gena metodom sekvenirovaniya u meticillinorezistentnyh shtammov *Staphylococcus aureus*, vydelennyh v stacionarah razlichnyh regionov Rossii i Belarusi. Zhurn mikrobiol, jepidemiol immunobiol 2005; 3: 27–32. [in Russian]
24. Романов А.В., Чернов Е.А. Молекулярная эпидемиология внутрибольничных золотистых стафилококков в стационарах различных регионов России. Молекуляр мед 2013; 4: 55–64. / Romanov A.V., Chernov E. A. Molekuljarnaja jepidemiologija vnutribol'nicnyh zolotistyh stafilocokkov v stacionarah razlichnyh regionov Rossii. Molekuljar med 2013; 4: 55–64.
25. Lindsay J.A. *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. Int J Med Microbiol 2014; 304: 2: 103–109.
26. Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Conly J.M. Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harbouring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 2: 531–540.

27. Chatterjee S.S., Chen L., Joo H.S., Cheung G.Y., Kreiswirth B.N., Otto M. Distribution and regulation of the mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulins PSM-mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One 2011; 6: 12: e28781.
28. Bouchami O., Ben Hassen A., de Lencastre H., Miragaia M. High prevalence of mec complex C and *ccrC* is independent of SCCmec type V in *Staphylococcus haemolyticus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 4: 605–614.
29. Ito T., Okuma K., Ma X.X., Yuzawa H., Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat 2003; 6: 1: 41–52.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Дмитренко Ольга Александровна — д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ патогенности (с группой стафилококковых инфекций) отдела бактериальных инфекций, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Анكيرская Алла Семеновна — д. м. н., профессор, научный консультант, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Любасовская Людмила Анатольевна — к. м. н., врач-бактериолог лаборатории микробиологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Ковалишина Ольга Васильевна — д. м. н., профессор кафедры эпидемиологии, Государственное бюджетное образова-

тельное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород

Попов Дмитрий Александрович — д. м. н., заведующий лабораторией клинической микробиологии и антимикробной терапии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева», Москва

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Сидоренко Сергей Владимирович — д. м. н., профессор, заведующий отделом медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Изучение лечебной эффективности Триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита у белых мышей

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. Л. РУСИНОВ²,
Е. Н. УЛОМСКИЙ², В. Н. ЧАРУШИН², О. Н. ЧУПАХИН², П. В. СОРОКИН³

¹ 48 Центральный НИИ Министерства обороны Российской Федерации, *Сергиев Посад*

² Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, *Екатеринбург*

³ Уральский центр биофармацевтических технологий, *Екатеринбург*

Investigation of Therapeutic Efficacy of Triazavirin Against Experimental Forest-Spring Encephalitis on Albino Mice

S. YA. LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, V. L. RUSINOV, E. N. ULOMSKY, V. N. CHARUSHIN, O. N. CHUPAKHIN, P. V. SOROKIN

Central Research Institute No. 48, Ministry of Defense of the Russian Federation, *Sergiev Posad*

Ural Federal University Named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, *Ekaterinburg*

Ural Centre of Biopharmaceutical Technologies, *Ekaterinburg*

Проведённый сравнительный анализ лечебной эффективности Триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита у белых мышей и эффективного лекарственного препарата — Рибавирина® выявил, что исследуемый препарат в высоких дозах (200—400 мг/кг) умеренно защищает инфицированных животных. Отмечено значительное увеличение показателя среднего времени жизни животных в опытных группах (от 4,1 до 4,8 суток), а также статистически ($p \leq 0,05$) значимое снижение уровня накопления вируса в органе-мишени — головном мозге.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, Триазавирин, Рибавирин®, лечение, противовирусная эффективность.

The comparative study of the therapeutic efficacy of Triazavirin against experimental Forest-Spring encephalitis on albino mice vs. the active drug Ribavirin® showed that in high doses (200—400 mg/kg) Triazavirin moderately protected the infected animals. A significant increase of the animal lifespan in the test groups (from 4.1 to 4.8 days) and a statistically ($p \leq 0.05$) valid decrease of the virus accumulation in the target organ (the brain) were observed.

Key words: Forest-Spring encephalitis, Triazavirin, Ribavirin®, therapy, antiviral efficacy.

Введение

В настоящее время эпидемическая обстановка в отношении клещевого энцефалита в Российской Федерации остается напряжённой. Территориально 48 регионов России являются эндемичными в отношении клещевого энцефалита [1]. По данным формам государственной статистической отчётности в 2014 г. зарегистрировано 1978 случаев клещевого энцефалита, из них 225 случаев среди детей. В 2014 г. зарегистрировано 23 летальных исхода от клещевого энцефалита, из них 1 — среди детей. Всего в 2014 году в субъектах Российской Федерации вакцинировано около 3 млн человек, что составило 74% от подлежащих вакцинации лиц, в том числе 64% детей [2].

Однако около 15—20% населения Российской Федерации не могут быть вакцинированы против

клещевого энцефалита в силу наличия иммунодефицита и/или опасности возникновения аллергических реакций после многократной иммунизации. Кроме того, вероятно, недостаточны проводимые дополнительные противоэпидемические мероприятия в регионах Российской Федерации (акарицидные обработки, применение новых средств индивидуальной защиты, внедрение экспресс методов диагностики, гигиеническое воспитание населения), позволяющие снизить уровень заболеваемости среди местного населения. Поэтому наличие отечественного противовирусного химиопрепарата, эффективного в отношении клещевого энцефалита обеспечит дополнительную защиту людей, посещающих эндемичные по этой инфекции районы.

Ранее на первом этапе исследований была выявлена эффективность Триазавирина в культуре клеток [3]. Поэтому было принято решение оценить его терапевтическую активность на лабораторных животных.

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 141306 Московская обл., Сергиев Посад-6. 48 Центральный НИИ Министерства обороны

Таблица 1. Результаты оценки лечебной эффективности триазавирина на белых мышах, инфицированных возбудителем клещевого энцефалита

Препарат	Доза препарата (суточная), мг/кг	Схема применения препарата	Защита животных от гибели, %	Средняя продолжительность жизни, $\bar{X}$	Увеличение средней продолжительности жизни, сутки, $\bar{X}$
Триазабирин	400	+24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	50,0	13,6	4,8
	200		45,0	13,2	4,5
	100		40,0	13,0	4,2
	10		30,0	12,9	4,1
Рибавирин	20	+24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	30,0	12,4	3,6
Контроль (без препарата)	—	—	—	8,8	—
Контроль	—	—	—	15,0	—

Таблица 2. Изучение влияния триазавирина на репродукцию вируса клещевого энцефалита в головном мозге при применении по лечебной схеме

Препарат	Доза препарата (суточная), мг/кг	Схема применения препарата	Уровень накопления вируса в головном мозге, lg БОЕ/мл, $\bar{X} \pm \delta_x$	Уровень снижения репродукции вируса в головном мозге, Δ lg, $\bar{X} \pm \delta_x$
Триазабирин	400	+24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	7,0 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,2
	200		7,1 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1
	100		7,5 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1
	10		8,8 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2
Контроль (без препарата)	—	—	9,4 $\pm$ 0,1	—

Целью представленной работы являлась терапевтическая оценка эффективности Триазавирина *in vivo* в отношении вируса клещевого энцефалита.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус клещевого энцефалита, штамм Софьин. Штамм хранится в Государственной коллекции ФГБУ «48ЦНИИ» Минобороны России.

Культура клеток. Использована постоянная культуры клеток почек свиньи — СПЭВ. В качестве ростовой среды и среды поддержания использовали полусинтетическую среду (ПС-4) на растворе Хенкса, содержащую 7,5 и 2% сыворотки крупного рогатого скота соответственно.

Лабораторные животные. Для моделирования экспериментальной формы клещевого энцефалита использовали белых мышей массой 10—12 г, полученных из вивария ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Наблюдение за инфицированными животными проводили в течение 15 суток. Титрование возбудителя КЭ проводили методом негативных колоний с использованием культуры клеток СПЭВ.

Исследуемый препарат. Исследуемый препарат «Триазабирин» предоставлен производителем ООО «Завод Медсинтез», Россия, г. Новоуральск

Контрольный препарат. Рибавирин производства ЗАО «ВЕРОФАРМ», Россия.

Оценка противовирусной эффективности используемых лекарственных препаратов осуществлена в соответствии с требованиями Минздрава РФ [4]. Основными критериями оценки эффективности *in vivo* являлись: показатели защиты лабораторных животных от гибели; средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных; подавление репродукции вируса в тканях головного мозга.

Результаты и обсуждение

По лечебной схеме триазабирин животным вводили перорально в объеме 50 мкл: через 24 ч после инфицирования и далее ежедневно в течение 4 суток, однократно в дозе от 10 до 400 мг/кг массы белых мышей.

Результаты оценки лечебной эффективности триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита (табл. 1) свидетельствуют, что препарат защищал от гибели 50, 45, 40 и 30% инфицированных вирусом клещевого энцефалита белых мышей при пероральном применении его в дозе 400, 200, 100 и 10 мг/кг соответственно. Увеличение показателя средней продолжительности жизни в группе леченных животных составило 4,8; 4,1; 3,9 и 4,1 сут при использовании суточных доз 400, 200, 100 и 10 мг/кг соответственно. Референс-препарат рибавирин при пероральном применении по лечебной схеме защищал от гибели 30% инфицированных животных.

В ходе изучения влияния триазавирина на репродукцию вируса клещевого энцефалита в тканях головного мозга установлено, что при применении его по лечебной схеме в концентрациях 400, 200, 100 и 10 мг/кг (табл. 2), препарат подавлял уровень размножения вируса в 250, 80—200, 50—80 и 15 раз соответственно.

Таким образом, при применении триазавирина в высоких дозах (200—400 мг/кг) по лечебной схеме препарат умеренно защищает белых мышей, парентерально инфицированных вирусом клещевого энцефалита. При этом отмечено значительное увеличение показателя среднего времени жизни животных в опытных группах (от 4,1 до 4,8 суток), а также статистически ($p \leq 0,05$) значимое снижение уровня накопления вируса в органе-мишени — головном мозге.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (14-13-01301) и ООО «Уральский центр биофармацевтических технологий»

ЛИТЕРАТУРА

1. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О перечне эндемичных территорий по клещевому вирусному энцефалиту в 2014 году», № 01/1260-15-27 от 10.02.2015 г. / Pis'mo Federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere zashhity prav po-trebitelej i blagopoluchija cheloveka «O perechne jendemichnyh territorij po kleshhevomu virusnomu jencefalitu v 2014 godu», № 01/1260-15-27 от 10.02.2015 g. [in Russian]
2. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «Об эпидемиологической ситуации по инфекциям, передающимся клещами, на территории Российской Федерации в 2014 году и прогнозе на 2015 год», № 01/2170-15-32 от 04.03.2015 г. / Pis'mo Federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere zashhity prav po-trebitelej i blagopoluchija cheloveka «Ob jepidemiologicheskoj situacii po infekcijam, peredajushhimsja kleshhami, na territorii Rossijskoj Federacii v 2014 godu i prognoze na 2015 god», № 01/2170-15-32 от 04.03.2015 g. [in Russian]
3. *Логинова С.Я., Борисевич С.В., Русинов В.Л., Уломский У.Н., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н.* Изучение противовирусной активности триазавирина в отношении возбудителя клещевого энцефалита в культуре клеток. Антибиотики и химиотер 2014; 1—2: 3—5. / Loginova S.Ja., Borisevich S.V., Rusinov V.L., Ulomskij U.N., Charushin V.N., Chupahin O.N. Izuchenie protivovirusnoj aktivnosti triazavirina v otnoshenii vozбудitelja kleshhevogo jencefalita v kul'ture kletok. Antibiotiki i himioter 2014; 1—2: 3—5. [in Russian]
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2012. / Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskix veshhestv. M.: Minzdrav RF, 2012. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Логинова Светлана Яковлевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник отдела опасных вирусных инфекций ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., к. м. н., профессор, начальник ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Русинов Владимир Леонидович — член-корр. РАН, д. х. н., директор Химико-технологического института УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина

Уломский Евгений Нарциссович — д.х.н., профессор кафедры органической и биомолекулярной химии УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина

Чарушин Валерий Николаевич — академик РАН, д. х. н., профессор кафедры органической и биомолекулярной химии УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина

Чупахин Олег Николаевич — академик РАН, д. х. н., заведующий кафедрой органической и биомолекулярной химии УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина

Оценка противоопухолевого действия погруженной культуры *Ophiocordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*

А. В. АВТОНОМОВА¹, Л. М. КРАСНОПОЛЬСКАЯ¹, М. И. ШУКТУЕВА¹, Е. Б. ИСАКОВА¹, В. М. БУХМАН²

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

² Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина, Москва

Assessment of Antitumor Effect of Submerged Culture of *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*

A. V. AVTONOMOVA, L. M. KRASNOPOLSKAYA, M. I. SHUKTUEVA, E. B. ISAKOVA, V. M. BUKHMAN,

G. F. Gause Research Institute of New Antibiotics, Moscow

N. N. Blokhin Russian Scientific Cancer Centre, Moscow

Метаболиты кордицепсов, относящихся к видам *Ophiocordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*, обладают высоким потенциалом для возможного использования в лечении различных опухолей и других заболеваний. Поиск и изучение биологической активности кордицепсов сохраняет актуальность в настоящее время. Были изучены противоопухолевые свойства погруженного мицелия *O.sinensis* и *C.militaris*. Сухая биомасса *O.sinensis* в дозе 50 мг/кг в сутки тормозила рост лимфолейкоза Р388, привитого подкожно мышам, на 65%. Сухая биомасса *C.militaris* была менее активна и тормозила рост опухоли на 54%. Водный экстракт погруженной культуры *O.sinensis* проявил высокую стимулирующую рост опухоли активность. Опухолевый узел лимфолейкоза Р388 у мышей под действием экстракта *O.sinensis* рос почти в два раза быстрее, чем в контрольной группе. Использование *O.sinensis* в качестве источника биологически активных субстанций требует особой тщательности и повышенного внимания, т.к. препараты этого гриба могут вызвать стимуляцию опухолевого роста.

Ключевые слова: метаболиты кордицепсов, *Ophiocordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, противоопухолевое действие.

Ophiocordyceps sinensis and *Cordyceps militaris* metabolites showed a high potential in the treatment of tumors as well as some other diseases. Antitumor properties of *O.sinensis* and *C.militaris* submerged mycelium were investigated. It was found that the *O.sinensis* dry biomass in a dose of 50 mg/kg administered once a day to the mice with subcutaneously inoculated P388 lympholeucosis lowered the tumor growth by 65% vs. 54% for the *C.militaris* dry biomass. The water extract of *O.sinensis* submerged culture however accelerated the growth of the P388 lympholeucosis tumor node in the mice almost two times, compared to the control. A greater caution in using this fungus as a source of biologically active substances is required since unwanted tumor-stimulating effects can arise.

Key words: fungi metabolites, *Ophiocordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, antitumor properties.

Введение

Одним из наиболее таинственных и загадочных лекарственных средств Тибета и Китая является «ярсгаумба». Это средство, как оказалось, создается на основе удивительных по своей экологии и биологии грибов-эндопаразитов насекомых из отдела сумчатых грибов (Ascomycota). Представители нескольких близкородственных родов этой группы, по сведениям медицины стран Юго-Восточной Азии, являются афродизиаком и обладают сильным адаптогенным и иммуномодулирующим действием. *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G. H. Sung, J. M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora — кордицепс китайский и *Cordyceps*

militaris (L.) Fr.-кордицепс военный — самые популярные виды этой группы.

В народной медицине около двух тысяч лет использовали плодовые тела кордицепсов, найденных в природе. Теперь в основном используются плодовые тела, выращенные искусственно.

За последние пятьдесят лет были обнаружены иммуномодулирующие, противоопухолевые, антидиабетические, гиполипидемические, антиоксидантные свойства культивируемых плодовых тел и мицелия *O.sinensis* и *C.militaris* [1]. В последние годы особенно популярным субстратом для получения биологически активных веществ кордицепсов стала мицелиальная культура, выращенная при погруженном культивировании.

Из плодовых тел, мицелия и культуральной жидкости были выделены разнообразные биологически активные вещества, обладающие пере-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 119021, Москва, Б. Пироговская ул., 11. НИИНА им Г. Ф. Гаузе РАМН

численными свойствами. Это внутриклеточные и внеклеточные полисахариды; нуклеозиды (кордицепин, аденозин, гуанозин и др.); стеролы (эргостерол, ситостерол и др.); пептиды (кордимин, мириоцин, циклодипептиды); статины и др [1].

Противоопухолевые свойства кордицепсов обусловлены в первую очередь прямым действием кордицепина — 3'-дезоксаденозина, а также опосредованным действием через иммунную систему упомянутого выше кордицепина и содержащихся в кордицепсах полисахаридов. И кордицепин, и полисахариды содержатся в плодовых телах и мицелии *O.sinensis* и *C.militaris* и в их водных экстрактах.

Мицелий *O.sinensis* индуцировал апоптоз мышечных опухолевых клеток Leydig MA-10 [2]. Погруженная мицелиальная культура *C.militaris* значительно тормозила пролиферацию клеток глиобластомы человека линий GBM8401 и U-87MG, вызывая остановку клеточного цикла в фазах G0/G1 и G2/M соответственно [3].

Водный экстракт из культивированных плодовых тел *O.sinensis* в экспериментах *in vitro* проявлял цитотоксичность в отношении клеток мышечной меланомы B16-BL6, мышечной карциномы Льюиса LLC [4], фибросаркомы HT1080 человека, карциномы толстой кишки человека [5]. В опытах *in vivo* водный экстракт *O.sinensis* увеличивал продолжительность жизни мышей с привитой фибросаркомой Meth A, карциномой Эрлиха [6]. На мышечной меланоме B16-BL6 водный экстракт плодовых тел *O.sinensis* усиливал действие метотрексата, увеличивая продолжительность жизни мышей [7]. Экстракт *C.militaris* ингибировал ангиогенез и рост опухолевых клеток меланомы человека [8, 9]. Экстракт *C.militaris* ингибировал рост клеток карциномы почки, вызывая апоптоз клеток и остановку клеточного цикла значительно сильнее, чем кордицепин в чистом виде [10]. Этилацетатный экстракт мицелия *O.sinensis* ингибировал пролиферацию и вызывал апоптоз клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 [11].

Кордицепин был впервые выделен из *C.militaris* в 1950 году [12]. Затем он был обнаружен и в других видах кордицепса [13]. В опытах *in vitro* было показано, что кордицепин обладает прямой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, вызывая апоптоз клеток рака простаты человека PC-3 [13], тормозя рост мышечной меланомы B16-BL6, мышечной карциномы Льюиса LLC. Кордицепин, выделенный из жидкой культуры *C.militaris*, *in vivo* тормозил рост мышечной асцитной опухоли Эрлиха и увеличивал продолжительность жизни мышей с опухолью [14], проявлял антиметастатическую активность [15]. Пероральное введение кордицепина ингибировало рост меланомы B16 у мышей без каких-либо системных побочных эффектов [13].

Экзополисахариды, полученные из культуральной жидкости кордицепсов, обладают иммуномодулирующими и противоопухолевым действием, способны напрямую индуцировать дифференциацию опухолевых клеток, повышать противоопухолевую активность организма путём активации его иммунных реакций. Полисахариды, выделенные из погруженной культуры *O.sinensis*, повышали активность перитонеальных макрофагов и лимфоцитов селезёнки у мышей с привитой опухолью, что приводило к проявлению противоопухолевого действия [16]. Экзополисахариды *O.sinensis* индуцировали созревание дендритных клеток, которые запускают иммунные реакции, ведущие к активации цитотоксических Т-лимфоцитов, которые в свою очередь играют одну из ключевых ролей в процессах иммунотерапии опухоли [17]. Помимо опосредованных через иммунную систему реакций, был показан эффект полисахаридов непосредственно на опухолевые клетки. Из погруженной культуры *O.sinensis* был выделен манноглюкан, обладающий невысокой ингибирующей активностью в отношении опухолевых клеток лёгкого линии SPC-I [18].

Поиск перспективных противоопухолевых субстанций ведётся непрерывно, поэтому неудивительно, что исследователи во всём мире, работающие с природными биологически активными субстанциями, проявляют постоянный интерес к кордицепсам вот уже более пятидесяти лет. Поиск, обнаружение и синтез новых субстанций для разработки эффективных лекарственных препаратов может напрямую повлиять на развитие отечественной фарминдустрии.

Целью настоящей работы было оценить противоопухолевое действие мицелиальной биомассы нескольких штаммов *O.sinensis* и *C.militaris*.

Материал и методы

В работе использовали штаммы 4 и 7 *O.sinensis* и штаммы 1002 и 1003 *C.militaris* из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений ФГБУ «НИИНА» РАМН.

Погруженное культивирование *O.sinensis* и *C.militaris* осуществляли в колбах вместимостью 0,75 л на ротационной качалке при 220 об/мин. Температура культивирования составляла 25°C. Среду стерилизовали при 1,2 атм в течение 30 мин. Среда содержала глюкозу — 20 г/л, соевую муку — 10 г/л, жидкий кукурузный экстракт — 0,5% по объёму, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,25 г/л и KH_2PO_4 — 2,5 г/л. Длительность процесса культивирования составляла 7 сут. Опыты ставили в трёх повторностях. Сухую погруженную биомассу получали путём отделения мицелия от культуральной жидкости центрифугированием при 3000 об/мин, с последующим промыванием дистиллированной водой и высушиванием до постоянного веса при температуре, не превышающей 45°C. Сухую погруженную биомассу *O.sinensis* и *C.militaris* дробили в порошок с использованием бытовой кофемолки.

Экстракт погруженной культуры *O.sinensis* получали путём автоклавирования погруженной культуры, содержащей культуральную жидкость и мицелий. Режим автоклавирования — 1,2 атм. 2 часа. Жидкую фазу автоклавированной погруженной культуры (экстракт) отделяли от мицелия с использованием бумажного фильтра и хранили при — 20°C.

Таблица 1. Противоопухолевое действие воздушно-сухой биомассы штамма 4 *O.sinensis*

Группа	14-е сут			18-е сут		
	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value
Контроль роста опухоли	193±54	—	—	1348±306	—	—
<i>O.sinensis</i> , штамм 4	67±31	65	0,065	608±171	55	0,053

Примечание. Здесь и в табл. 2–5: * РМО — расчётная масса опухоли; ** ТРО — торможение роста опухоли.

Таблица 2. Противоопухолевое действие воздушно-сухой биомассы штамма 7 *O.sinensis*

Группа	14-е сутки			17-е сутки		
	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value
Контроль роста опухоли	132±33	—	—	715±106	—	—
<i>O.sinensis</i> , штамм 7	48±32	63	0,090	441±143	38	0,098

Таблица 3. Противоопухолевое действие воздушно-сухой биомассы штамма 1002 *C.militaris*

Группа	14-е сутки			18-е сутки		
	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value
Контроль роста опухоли	193±54	—	—	1348±306	—	—
<i>C.militaris</i> штамм 1002	203±102	-5	0,929	899±268	33	0,285

Таблица 4. Противоопухолевое действие воздушно-сухой биомассы штамма 1003 *C.militaris*

Группа	14-е сутки			18-е сутки		
	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value
Контроль роста опухоли	193±54	—	—	1348±306	—	—
<i>C.militaris</i> штамм 1003	127±56	34	0,416	620±188	54	0,062

Таблица 5. Эффект экстракта погруженной культуры *O.sinensis* на модели привитого подкожно Т-лимфолейкоза Р388

Группа	14-е сутки			17-е сутки		
	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value	РМО*, мг	ТРО**, %	p-value
Контроль роста опухоли	164±34	—	—	1354±261	—	—
<i>O.sinensis</i> , штамм 7	319±58	-95	0,100	1367±215	-1	0,996

Противоопухолевое действие препаратов кордицепсов оценивали на мышах с привитым подкожно лимфолейкозом Р388. Мышей получали из питомника РАМН «Крюково» и выдерживали в карантине 21 день. Количество мышей в контрольных и экспериментальных группах составляло 8–11 животных. Опухоли прививали гибридным мышам C57B1/6J x DBA/2F1 (BDF1), самцам. Мышам в день «0» опыта подкожно вводили суспензию клеток лимфолейкоза Р388 1×10^6 опухолевых клеток. Лечение проводили в течение 10 сут (с 3 по 12-е сут) и в течение 15 сут (с 3 по 17-е сут). Суточная доза сухой погруженной биомассы составляла 50 мг/кг, экстракт погруженной культуры — 0,25 мл/мышь. Препараты вводили внутривенно с помощью зонда. Сухую биомассу вводили в виде суспензии в крахмальном клейстере (0,25 мл/мышь). В течение опытов следили за общим состоянием мышей, изменением массы тела, динамикой роста опухоли. Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле: $\text{ТРО} (\%) = (M_k - M_0) / (M_k) \times 100$, где M_k и M_0 — средняя расчётная масса опухоли (РМО) в контроле и опыте соответственно. Массу опухоли рассчитывали по формуле $M (\text{мг}) = (a \times b \times c) / 2$, где M — расчётная масса опухоли, a , b , c — три наибольших взаимоперпендикулярных диаметра опухолевого узла в мм. Достоверность различий средних определяли по t -критерию Стьюдента. За достоверные принимали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Противоопухолевое действие мицелиальной биомассы *O.sinensis* и *C.militaris* оценивали *in vivo*. Мышам BDF1 с привитым подкожно лимфолейко-

зом Р388 вводили внутривенно сухую биомассу кордицепсов в виде суспензии в дозе 50 мг/кг.

Воздушно-сухая мицелиальная биомасса *O.sinensis* оказывала умеренное противоопухолевое действие, выражавшееся в торможении роста подкожного опухолевого узла. Ежедневное внутривенное введение в течение 10 суток биомассы *O.sinensis* штамм 4 привело к торможению роста опухоли на 65% (табл. 1). Торможение роста опухоли при введении биомассы штамма 7 *O.sinensis* составило на 14-е сутки 63% (табл. 2).

Противоопухолевое действие мицелиальной биомассы *C.militaris* в наших опытах было мало выражено. В группе животных, получавших биомассу штамма 1002 *C.militaris*, противоопухолевый эффект отсутствовал (табл. 3). Мицелиальная биомасса штамма 1003 *C.militaris* проявила невысокий противоопухолевый эффект. На 18-е сутки опыта ТРО в группе, получавшей мицелиальную биомассу штамма 1003 *C.militaris*, составило 54% (табл. 4).

В отличие от воздушно-сухой мицелиальной биомассы экстракт погруженной культуры *O.sinensis* штамм 7 оказал сильное стимулирующее действие на рост подкожного опухолевого узла лимфолейкоза Р388 (табл. 5). В опытных группах у

мышей, которым вводили водный экстракт этого гриба, опухоль росла в два раза быстрее, чем в контроле. Стимулирующий рост опухоли эффект экстракта был получен, несмотря на то что способ приготовления экстракта погруженной биомассы был ранее опробован на других культурах грибов. Ранее в наших работах подобная экстракция всегда давала положительные результаты. Так, смесь приготовленных по описанной выше методике экстрактов погруженной культуры видов *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor* и *Hypsizygus ulmarius*, проявляла достоверный выраженный противоопухолевый эффект на той же модели опухоли, которая описана в настоящей статье [19]. Результаты говорят о том, что приготовление новых экстрактов по уже отработанным методикам не всегда ведёт к положительному результату. Это особенно важно иметь в виду при приготовлении лекарственных препаратов из новых субстанций.

Заключение

Метаболиты кордицепсов, относящихся к видам *O.sinensis* и *C.militaris*, обладают высоким по-

тенциалом для использования в медицине для поддерживающего и сочетанного лечения различных опухолей и других заболеваний.

В работе было показано, что сухая биомасса обоих исследованных штаммов *O.sinensis* обладала противоопухолевым эффектом, выражавшимся в достижении 63–65% торможения опухоли. Сухая биомасса штамма *C.militaris* была малоактивна. Биомасса только одного штамма *O.sinensis* 1003 проявила противоопухолевую активность. Было отмечено торможение роста опухоли на 54%.

Экстракт погруженной культуры *O.sinensis* штамм 7 проявил высокую активность, стимулирующую рост опухоли почти в два раза. Использование *O.sinensis* для создания новых биологически активных субстанций требует повышенного внимания, а проведение работы и разработка методики получения субстанции — особой тщательности, т. к. возможна стимуляция опухолевого роста под влиянием препаратов из кордицепсов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lo H.C., Hsieh C., Lin F.Y., Hsu T.H. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Othiocordyceps sinensis* in Dong-ChongXiaCao and related bioactive ingredients. J Tradit Complement Med, 2013; 3: 16–32.
2. Yang H.Y., Leu S.F., Wang Y.K., Wu C.S., Huang B.M. Cordyceps sinensis mycelium induces MA-10 mouse Leydig tumor cell apoptosis by activating the caspase-8 pathway and suppressing the NF-kappaB pathway. Arch Androl, 2006; 52: 103–110.
3. Yang C.H., Kao Y.H., Huang K.S., Wang C.Y., Lin L.W. Cordyceps militaris and mycelial fermentation induced apoptosis and autophagy of human glioblastoma cells. Cell Death Dis, 2012; 3: e431.
4. Nakamura K., Yamaguchi Y., Kagota S., Kwon Y.M., Shinozuka K. and Kunitomo M. Inhibitory effect of Cordyceps sinensis on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice. Jpn J Pharmacol, 1999; 79: 335–341.
5. Yoshikawa N., Nishiuchi A., Kubo E., Yamaguchi Y., Kunitomo M., Kagota S. et al. Cordyceps sinensis acts as an adenosine A3 receptor against on mouse melanoma and lung carcinoma cells, and human fibrosarcoma and coloncarcinoma cells. Pharmacol Pharm, 2011; 2: 266–270.
6. Yoshida J., Takamura S., Yamaguchi N., Ren L.J., Chen H., Koshimura S., Suzuki S. Antitumor activity of an extract of Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines. Jpn J Exp Med, 1989; 59: 157–161.
7. Nakamura K., Konoha K., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M. Combined effects of Cordyceps sinensis and methotrexate on hematogenic lung metastasis in mice. Recept Channel, 2003; 9: 329–334.
8. Ruma I.M., Putranto E.W., Kondo E., Watanabe R., Saito K., Inoue Y., Yamamoto K., Nakata S., Kaihata M., Murata H., Sakaguchi M. Extract of Cordyceps militaris inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth of human malignant melanoma cells. Int J Oncol, 2014; 45: 209–218.
9. Yoo H.S., Shin J.W., Cho J.H., Son C.G., Lee Y.W., Park S.Y., Cho C.K. Effects of Cordyceps militaris extract on angiogenesis and tumor growth. Acta Pharmacol Sin, 2004; 25: 657–665.
10. Yamamoto K., Shichiri H., Uda A., Yamashita K., Nishioka T., Kume M., Makimoto H., Nakagawa T., Hirano T., Hirai M. Apoptotic effects of the

extracts of Cordyceps militaris via erk phosphorylation in a renal cell carcinoma cell line. Phytother Res, 2015; 29: 707–713.

11. Zhang Q., Wu J., Hu Z., Li D. Induction of HL-60 apoptosis by ethyl acetate extract of Cordyceps sinensis fungal mycelium. Life Sci, 2004; 75: 2911–2919.
12. Cunningham K.G., Manson W., Spring F.S., Hutchinson S.A. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of Cordyceps militaris (Linn.) Link. Nature, 1950; 166: 949.
13. Yoshikawa N., Nakamura K., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M. Antitumor activity of cordycepin in mice. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol, 2004; 31: 351–353.
14. Jagger D.V., Kredich N.M., Guarino A.J. Inhibition of Ehrlich mouse ascites tumor growth by cordycepin. Cancer Res, 1961; 21: 216–220.
15. Nakamura K., Konoha K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M. Effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on hematogenic lung metastatic model mice. In Vivo, 2005; 19: 135–142.
16. Zhang W., Li J., Qiu S., Chn J., Zheng Y. Effects of the exopolysaccharide fraction (EPSF) from cultivated Cordyceps sinensis on immunocytes of H22 tumor bearing mice. Fitoterapia, 2008; 79: 168–173.
17. Song D., Lin J. Y., Yuan F. J., Zhang W. Ex vivo stimulation of murine dendritic cells by an exopolysaccharide from one of the anamorph of Cordyceps sinensis. Cell Biochemistry and Function, 2011; 29: 555–561.
18. Wu Y., Hu N., Pan Y., Zhou L., Zhou X. Isolation and characterization of a mannoglucan from edible Cordyceps sinensis mycelium. Carbohydr Res, 2007; 342: 870–875.
19. Бухман В.М., Исакова Е.Б., Антимонова А.В., Белицкий И.В., Либензон А.В., Краснополянская Л.М. Изучение противоопухолевых свойств мицелия лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst в опытах *in vivo*. Успехи медицинской микологии. Материалы первого всероссийского конгресса по медицинской микологии. М.: 2003; 1: 245–247. / Buhman V.M., Isakova E.B., Antimonova A.V., Belickij I.V., Libenzon A.V., Krasnopol'skaja L.M. Izuchenie protivoopuholevych svojstv micelija lekarstvennogo griba *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst v opytah *in vivo*. Uspehi medicinskoj mikologii. Materialy pervogo vsrossijskogo kongressa po medicinskoj mikologii. M.: 2003; 1: 245–247. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Автономова Анастасия Витальевна — к. б. н., старший научный сотрудник, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Краснополянская Лариса Михайловна — д. б. н., заведующий лабораторией, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Шуктеева Мария Ильинична — научный сотрудник, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Исакова Елена Борисовна — научный сотрудник, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Бухман Владимир Михайлович — д. м. н., профессор, заведующий лабораторией, НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, Москва

Интенсификация этиотропной терапии больных запущенным туберкулёзом лёгких с использованием иммуномодуляторов

В. М. КОЛОМИЕЦ¹, А. В. АБРАМОВ², Н. В. РАЧИНА¹, Н. В. РУБЛЕВА¹

¹ Курский государственный медицинский университет Минздрава России, Курск

² Областной клинический противотуберкулёзный диспансер, Курская обл., Щетинка

Immunomodulator Intensification of Etiotropic Therapy in Patients with Advanced Pulmonary Tuberculosis

V. M. KOLOMIETS, A. V. ABRAMOV, N. V. RACHINA, N. V. RUBLEVA

Kursk State Medical University, Kursk

Regional Clinical Antituberculosis Dispensary, Kursk Region, Tschetinka

Изучена возможность повышения эффективности терапии больных запущенными формами туберкулёза за счёт включения в схемы лечения иммуномодулирующих препаратов. Проведён анализ данных 6034 больных запущенными формами, преимущественно фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких (ФКТЛ) с использованием метода рандомизации. Сформированы четыре группы: первая — пациенты, получившие кроме этиотропной терапии комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий (КЛРМ), включающий препарат Циклоферон; вторая — получившие на фоне этиотропной терапии и КЛРМ препарат «Омега-3»; третья — пациенты, получавшие этиотропную терапию и КЛРМ; четвертая — больные, получавшие только этиотропную терапию. У 3419 больных был диагностирован впервые выявленный туберкулёз лёгких, у 340 — рецидивирующая форма заболевания, а у 2275 пациентов — длительное течение процесса. Эффективность этиотропной терапии оценивали после проведения интенсивной фазы длительностью не более 3 месяцев, а при выявлении лекарственно-устойчивых форм микобактерий (ЛУ-МБТ) и наличии других отягощающих факторов — в течение 5 месяцев. Полученные результаты подтверждают положение, что включение в схему лечения иммуномодулирующих препаратов позволяет повысить эффективность терапии, приверженность лечению и ускорить процесс прекращения бактериовыделения. Включение в схемы терапии больных с ФКТЛ циклоферона позволило сократить сроки бактериовыделения возбудителя (в том числе при ЛУ-МБТ) у $94,1 \pm 3,33\%$ больных, несмотря на наличие у них сопутствующих заболеваний. Вероятно, что эффект применения препарата обусловлен как его прямым иммунопротективным действием, так и за счёт улучшения общего состояния пациента и повышения его приверженности лечению.

Ключевые слова: фиброзно-кавернозный туберкулёз лёгких, противотуберкулёзная химиотерапия, иммуномодуляторы, циклоферон.

The study was aimed at possible increase of the therapy efficacy in patients with advanced tuberculosis by including immunomodulators to the treatment schemes. The data concerning 6034 patients with advanced tuberculosis, mainly fibrocavernous tuberculosis of the lungs, were analysed. Four groups of the patients were randomized. In group 1 the management of the patients included etiotropic therapy and some treatment and rehabilitation measures with the use of Cycloferon. The group 2 patients in addition to the etiotropic therapy and some treatment and rehabilitation measures were given Omega-3. In group 3 the management included the etiotropic therapy and some treatment and rehabilitation measures. In group 4 the etiotropic therapy was used alone. The analysis showed that 3419 patients had primary pulmonary tuberculosis, 340 patients had relapsing tuberculosis and 2275 patients had long-term process. The etiotropic therapy efficacy was estimated after an intensive phase of not more than 3 months. In the cases with *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance and some other unfavourable factors it was estimated after a 5-month intensive phase. The results confirmed that inclusion of immunomodulators to the treatment schemes allowed to increase the therapy efficacy and the patients' adherence to the treatment, as well as to shorten the period of the bacteria carriage. Thus, the use of Cycloferon in the schemes of the treatment of the patients with fibrocavernous pulmonary tuberculosis allowed to shorten the period of the pathogen carriage (as well as the drug resistant forms) in $94.1 \pm 3.33\%$ of the patients in spite of concomitant diseases. The effect of Cycloferon in such cases was likely due to both its direct immunoprotective action and the improvement of the general state of the patients and their higher adherence to the treatment.

Key words: fibrocavernous pulmonary tuberculosis, antituberculosis chemotherapy, immunomodulators, Cycloferon.

Введение

Эпидемическая ситуация по туберкулёзу в России ещё далека от прогнозируемой и даже

при достижении её стабилизации необходима интенсификация лечения в качестве основного противоэпидемического мероприятия [1, 2]. Эффективность стандартизированной этиотропной терапии (ЭТ) в течение последних лет, несмотря на внедрение новых режимов и препаратов, повышается крайне медленно. Между тем

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 305004, Курск, ул. Карла Маркса, 3. КГМУ

именно интенсификация лечения позволит снизить экономическое бремя туберкулёза. Однако, несмотря на проводимые мероприятия в рамках Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями», закрытие полостей распада на фоне применения стандартных режимов химиотерапии наблюдалось среди впервые выявленных больных в 61,5% случаев (в 2005 г. — 37,2%), у больных с рецидивом туберкулёза — в 41,7% случаев [3, 4]. Особую тревогу вызывает низкая эффективность ЭТ больных с запущенными формами туберкулёза, которые являются основным источником инфекции [5, 6].

Целью исследования явилось изучение возможности повышения эффективности терапии больных запущенными формами туберкулёза за счёт включения в схемы лечения иммуномодулирующих препаратов.

Материал и методы

Для решения поставленной задачи был проведён анализ данных 6034 больных, находившихся на стационарном лечении на клинической базе ГБОУ ВПО КГМУ в 2009—2013 гг. В базисной терапии применялись стандартные режимы в соответствии с Приказом Минздрава России №109 и рекомендациями ВОЗ [7, 8]. Оценка эффективности лечения проводилась по следующим критериям:

- исчезновение или значительное уменьшение симптомов интоксикации, проявлений грудного синдрома, нормализация показателей периферической крови;
- динамика морфологических изменений: уменьшение количества очагов, участков инфильтративных изменений, размеров деструктивных изменений (полостей), рубцевание полостей (по данным R- рентгенологических методов исследования);
- прекращение бактериовыделения (по данным микроскопии мокроты или посева, на 2-й, 3-й и 5-й месяцы интенсивной фазы основного курса лечения).

Для решения поставленных задач методом рандомизации были сформированы четыре группы больных запущенными формами, преимущественно фиброзно-кавернозным туберкулёзом лёгких (ФКТЛ):

Первая — пациенты ФКТЛ, получавшие, кроме этиотропной терапии, комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий (КЛРМ), включающий препарат «Циклоферон» (ООО НТФФ ПОЛИСАН, Санкт-Петербург);

Вторая — пациенты ФКТЛ, которые, кроме этиотропной терапии, получали комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий, включая препарат «Омега-3»;

Третья — пациенты ФКТЛ, которые получали этиотропную терапию и комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий;

Четвертая — больные ФКТЛ, получавшие только этиотропную терапию.

У всех пациентов были проведены стандартные общеклинические, рентгенологические и лабораторные исследования.

Циклоферон разрешён к использованию при лечении туберкулёза с 2006 года [9]. Препарат является индуктором интерферона (IFN), эндогенно синтезируется собственным IFN (преимущественно γ), в отличие от рекомбинантных, не обладает антигенными свойствами. Путём повышения выработки IFN ЦФ способствует восстановлению Т-клеточного звена иммунитета: нормализует уровни субпопуляций CD4+, а также количество CD16+ (естественных киллеров), CD8+,

CD72+ (Т-лимфоцитов), что клинически может проявляться ускорением положительной динамики клинических проявлений, снижением массивности или прекращением бактериовыделения, положительной динамикой экссудативных проявлений, инволюцией очагово-инфильтративных проявлений и закрытием полостей распада [10].

Приверженность больных лечению (ПБЛ) определялась количественно по авторской методике (заявка № 2013148315 от 29.10.2013г.). Пациенту предлагалась специальная анкета, позволяющая выявить как объективные факторы, мешающие лечению (побочное действие лекарств или несложившийся профессиональный контакт с медперсоналом), так и субъективные (стресс, фрустрация, стигматизация, легкая внушаемость и пристрастие к алкоголю) факторы. Язык анкеты доступен и свободен, респондент не решает при анкетировании сложных задач, количество вопросов ограничено (80). Степень ПБЛ определяется путём подсчёта положительных и отрицательных «сырых» баллов и перевода их в звезды: 1—2 звезды — неудовлетворительная приверженность лечению, склонность к нарушениям больничного режима, отсутствие эффекта лечения, частые рецидивы и обострения; 3—5 звезд — удовлетворительная приверженность лечению — умеренные нарушения больничного режима в экстремальных ситуациях, плохие результаты терапии, редкие рецидивы и обострения; 6—8 — хорошая приверженность лечению; 9—10 — высокая приверженность лечению — низкая вероятность нарушений больничного режима, высокая эффективность лечения. Возможны единичные кратковременные нарушения больничного режима в экстремальных ситуациях, низкая вероятность рецидивов и обострений.

Благодаря индивидуальному характеру анкеты возможна оценка результатов тестирования в сопоставлении с другими данными истории болезни и созданием психофизиологической ситуации для конкретного больного. В дальнейшем, оценив степень ПБЛ и обозначив основные предопределяющие факторы, можно назначить терапию, направленную на их нейтрализацию и соответственно — на повышение качества лечения и реабилитации.

Формат исследования одобрен региональным Этическим комитетом 11 ноября 2013 года (выписка № 8).

Статистическая обработка материалов исследования включала вычисление степени достоверности различий между математическими ожиданиями в сравниваемых группах, которые считались достоверными при величине уровня вероятности менее 0,05 (5%). Обработка данных проводилась с использованием современных программных комплексов Microsoft Windows-XP и применением стандартных пакетов статистических программ MS Excel, SPSS (версия 13.0), Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.).

Результаты и обсуждение

По результатам обследования у 3419 больных был диагностирован впервые выявленный туберкулёз лёгких, у 340 — рецидивирующая форма заболевания, а у 2275 пациентов — длительное течение процесса. Эффективность этиотропной терапии оценивали после проведения интенсивной фазы длительностью не более 3 месяцев, а при выявлении лекарственно-устойчивых форм микобактерий (ЛУ-МБТ) и наличии других отягощающих факторов — в течение 5 месяцев.

Большинство больных были в возрасте 30—49 лет — 83% (95% ДИ 80,8—91,6), женщин было 12% (95% ДИ 6,2—20,5). Анализ социального статуса пациентов показал, что, несмотря на работоспособный возраст, в 91% случаев (95% ДИ

Показатели эффективности лечения больных ($M \pm m$) за период 2009—2013 гг.

Годы	Показатель		Характеристика процесса			Летальность
	CV	МБТ	улучшение	без динамики	прогрессирование	
Впервые выявленный туберкулёз лёгких (В/В)						
2009	44,3±2,5	59,4±2,4	74,9±5,2	10,8±2,3	1,6±0,8	2±0,6
2013	60,1±3,1*	81,6±2,4*	87,1±3,7	11,4±2,6	0	4±1,0*
Длительное течение туберкулёза лёгких						
2009	23,3±2,9	46,4±3,7	74,2±4,3	24±6,0	5,3±2,4*	14,5±2,4
2013	11,7±1,8*	37,1±2,9*	82±2,8	12,3±5,3	0,5±0,7	12,9±1,9
Рецидивирующее течение туберкулёза лёгких						
2009	31,6±7,5	60±7,7	73,8±10,7	24,6±12,4*	6,6±5,1	1,6±1,9
2013	16,1±8,7	66,7±8,2	90,2±7,7	4,9±9,7	0	10,9±5,1*

Примечание. * — статистически достоверно, $p < 0,05$; CV — рубцевание деструктивных изменений; МБТ — прекращение бактериовыделения.

83,0—95,9) они не работали, а 42% из них (95% ДИ 32,8—52,2) в течение от 2 до 4 лет находились в местах лишения свободы (МЛС).

За период наблюдения количество пациентов с деструктивными формами заболевания и бактериовыделением среди впервые выявленных больных существенно не изменилось (51,5—55,4% и 54,7—58,4% соответственно). В то же время отмечено увеличение выделения микобактерий туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-МБТ) — с 16,1 до 30,1% ($p < 0,05$). Аналогичные изменения были зарегистрированы среди пациентов с рецидивирующим и хроническим течением процесса, причём среди последних удельный вес бактериовыделителей с МЛУ-МБТ был самым высоким — 55,7±3,7—68,4±2,8%.

Показатели эффективности интенсивной фазы ЭТ в условиях стационара составили: положительный эффект от проведённой терапии — у 82,60% пациентов, прекращение бактериовыделения — у 58,71% и рубцевание полостных образований — у 32,69% больных. При анализе данных по формам процесса показатели составили соответственно: 86,69, 74,89 и 52,86% — у впервые выявленных больных; 84,41, 61,60 и 29,96% — в случаях рецидивирующего течения; 76,18, 39,07 и 12,60% — при длительном течении туберкулёзного процесса (таблица).

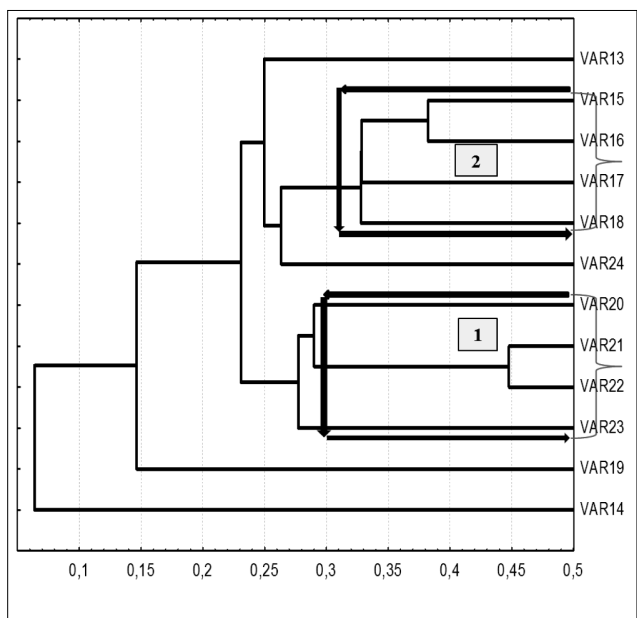
Корреляционный анализ параметров состояния больных и оценка степени их влияния на эффективность проводимой терапии выявили слабо выраженные, хотя и достоверные связи между различными факторами. Так, было выявлено, что приверженность больных лечению зависела от применения препарата циклоферон ($r = +0,435$), но её уровень снижался при малой эффективности ЭТ ($r = -0,852$), наличии сопутствующих заболеваний ($r = -0,308$), побочных реакций ($r = -0,203$), отсутствии эффекта от предыдущего курса лечения ($r = -0,265$) и экономическом неблагополучии больного ($r = -0,244$). Сказывалось влияние состояния интоксикации больного и его настроений на лечение ($r = +0,830$). Было установлено, что возраст

пациентов существенно не влиял на результаты лечебно-реабилитационных мероприятий.

При анализе данных у больных, получивших омега-3, была выявлена слабая обратная корреляция между положительным эффектом применения препарата и возрастом больных ($r = -0,153$). Более тесная связь обнаружена между пребыванием больных в местах лишения свободы и рецидивами туберкулёза лёгких ($r = +0,174$). У этой же категории лиц выявлена положительная корреляция с частотой устойчивости к препаратам ЭТ ($r = +0,205$), в связи с чем они чаще лечились по индивидуальному режиму ($r = +0,176$) и у них чаще обнаруживались побочные реакции на лечение ($r = +0,203$).

Сопутствующие заболевания существенно снижали эффект лечения ($r = +0,156$) и отрицательно влияли на взаимоотношения с медицинским персоналом ($r = +0,171$). Они же снижали эффективность применения омега-3 ($r = +0,168$). Положительный лечебный эффект препарата коррелировал с течением туберкулёза и был более выражен при впервые выявленном процессе ($r = +0,158$). Режим лечения очень тесно был связан с характером выявления туберкулёза по принципу прямой корреляции ($r = +0,858$), с устойчивостью микобактерий к препаратам ЭТ ($r = +0,496$) и с сопутствующими заболеваниями ($r = +0,183$) и был обратно связан с выраженностью приверженности ($r = -0,395$).

В целом, статистически была подтверждена зависимость эффективности лечения с картиной течения туберкулёза лёгких ($r = +0,272$), наличием сопутствующих заболеваний ($r = +0,196$) и интенсивностью (частотой) побочных реакций ($r = +0,230$). Состояние стресса положительно коррелировало с высокой фрустрацией ($r = +0,382$), меньше — со стигматизацией ($r = +0,294$), побочными реакциями на лечение ($r = +0,225$) и отсутствием эффекта от проводимых лечебно-реабилитационных мероприятий ($r = +0,168$). Больные с высокой внушаемостью страдали от стигматизации ($r = +0,228$), меньше от фрустрации ($r = +0,173$)



Влияние различных факторов на эффективность иммуномодулирующей терапии.

1 — изолированное применение препарата омега-3; 2 — изолированное применение препарата циклоферон.

и экономического неблагополучия ($r=+0,214$). В этой категории больных сильно выражено влияние низкого эффекта лечения ($r=-0,173$). Интересные данные получены о связи побочных реакций с фрустрацией ($r=+0,225$), в меньшей степени — с сопутствующими заболеваниями ($r=+0,183$). В то же время побочные реакции существенно влияли на низкий эффект лечения ($r=+0,448$) и отрицательно сказывались на отношениях с медперсоналом ($r=+0,229$). Высокая приверженность лечению прямо коррелировала с эффективностью лечения и была установлена при благоприятном течении процесса у $100,0 \pm 1,6\%$ больных. Средний уровень приверженности сочетался с положительным эффектом лечения в $24,04 \pm 4,21\%$ случаев. При низкой приверженности у $83,33 \pm 11,24\%$ больных отмечено ухудшение клинического течения процесса.

На дендрограмме (рисунок) показана связь факторов, влияющих на эффективность лечения при изолированном назначении препаратов омега-3 и циклоферон.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коломиец В.М. Современные оценки эпидемической ситуации по туберкулёзу. Туберкулёз и болезни лёгких. 2011; 4: 200—201. / Kolomiec V.M. Sovremennye ocenki jepidemicheskoi situacii po tuberkuljozu. Tuberkuljoz i bolezni legkih. 2011; 4: 200—201. [in Russian]
2. Туберкулёз. Особенности течения, возможности фармакотерапии. Учебное пособие для врачей / Под редакцией профессора А. К. Иванова. СПб.: 2009; 108. / Tuberkuljoz. Osobennosti techenija, vozmozhnosti farmakoterapii. Uchebnoe posobie dlja vrachej / Pod redakciej professora A. K. Ivanova. SPb.: 2009; 108. [in Russian]
3. Васильева И.А., Эргешов А.Э., Самойлова А.Г., Киселева Ю.Ю., Иванов А.К., Яблонский П.К. Отдалённые результаты применения

Проведённый кластерный анализ подтвердил влияние на эффективность лечебно-реабилитационных мероприятий большого количества факторов. Наиболее тесно связаны между собой: пребывание в местах лишения свободы (Var 2), характер процесса (Var 6), режим лечения, назначенный с учётом характера лекарственной устойчивости (Var 13).

При изолированном назначении препарата циклоферона отмечена связь таких факторов, входящих в общий показатель приверженности лечению, как состояние психологического статуса (Var 15), стресс (Var 16), стигматизация (Var 17) и внушаемость (Var 18).

При назначении омега-3 отмечена связь факторов социально-психологического статуса (Var 20), побочных эффектов лечения (Var 21) и низкого эффекта от проводимой терапии (Var 22).

Заключение

Полученные результаты исследований повышения эффективности этиотропной терапии подтверждают положение, что неблагоприятные исходы лечения больных с ФКТЛ как основной формы запущенного туберкулёза наблюдаются у пациентов с хроническим течением заболевания ($F6=0,89$), наличием полирезистентных форм возбудителя ($F8=0,65$) и среди лиц, освободившихся из МЛС ($F2=0,34$).

Однако включение в схему лечения иммуномодулирующих препаратов позволяет повысить эффективность терапии, приверженность лечению и ускорить процесс прекращения бактериовыделения.

Так, включение в схемы терапии больных с ФКТЛ циклоферона позволило сократить сроки бактериовыделения возбудителя (в том числе ЛУ-МБТ) у $94,1 \pm 3,33\%$ больных, несмотря на наличие у них сопутствующих заболеваний. Вероятно, что эффект применения препарата обусловлен как его прямым иммунопротективным действием, так и опосредовано — за счёт улучшения общего состояния пациента и повышения его приверженности лечению.

стандартных режимов химиотерапии у больных туберкулёзом органов дыхания. Туберкулёз и болезни лёгких. 2012; 4: 3—8. / Vasil'eva I.A., Jergeshov A.Je., Samojlova A.G., Kiseleva Ju.Ju., Ivanov A.K., Jablonskij P.K. Otdalennye rezul'taty primeneniya standartnyh rezhimov himioterapii u bol'nyh tuberkuljozom organov dyhaniya. Tuberkuljoz i bolezni legkih. 2012; 4: 3—8. [in Russian]

4. Нечаева О. Б., Стерликов С.А., Хуриева Н.Б. Целевые индикаторы и показатели государственной программы развития здравоохранения России до 2020 года. Туберкулёз и болезни лёгких. 2014; 12: 200—201. / Nechaeva O. B., Sterlikov S.A., Hurieva N.B. Celevye indikatory i pokazateli gosudarstvennoj programmy razvitiya zdavoohranenija Rossii do 2020 goda. Tuberkuljoz i bolezni legkih. 2014; 12: 200—201. [in Russian]

5. Гельберг И.С., Вольф С.Б., Алексо Е.Н., Авласенко В.С., Коломиец В.М., Коноркина Е.А. Факторы риска развития туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Курский научно-практич. вестн. «Человек и его здоровье». 2015; 1: 17—22. / Gel'berg I.S., Vol'f S.B., Alekso E.N., Avlasenko V.S., Kolomiec V.M., Konorkina E.A. Faktory riska razvitija tuberkuljoza s mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivost'ju vozбудitelja. Kurskij nauchno-praktich. vestn. «Chelovek i ego zdorov'e». 2015; 1: 17—22. [in Russian]
6. Шилова М.В. Туберкулёз в России в 2012—2013 году, монография. М.: 2014; 244. / Shilova M.V. Tuberkuljoz v Rossii v 2012—2013 godu, monografija. M.: 2014; 244. [in Russian]
7. «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации». Приказ Министерства здравоохранения РФ №109 от 21 марта 2003. Консультант Плюс: справочно-правовая система. Режим доступа: <http://www.consultant.ru> / «O sovershenstvovanii protivotuberkuljoznyh meroprijatij v Rossijskoj Federacii». Prikaz Ministerstva zdravooxranenija RF №109 ot 21 marta 2003. Konsul'tant Pljus: spravочно-pravovaja sistema. Rezhim dostupa: <http://www.consultant.ru> [in Russian]
8. The stop TB strategy. Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals, WHO, 2006; 24. [in Russian]
9. «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным туберкулёзом». Приказ Минздравсоцразвития № 572 от 21.06.2006. КонсультантПлюс: справочно-правовая система. Режим доступа: <http://www.consultant.ru> / Ob utverzhdenii standarta medicinskoj pomoshhi bol'nym tuberkuljozom». Prikaz Minzdravsocrazvitija № 572 ot 21.06.2006. Konsul'tant Pljus: spravочно-pravovaja sistema. Rezhim dostupa: <http://www.consultant.ru> [in Russian]
10. Циклоферон в клинической пульмонологии: Пособие для врачей / Под ред. М. Г. Романцова. СПб.: 2005; 88. / Cikloferon v klinicheskoy pul'monologii: Posobie dlja vrachej / Pod red. M. G. Romancova. SPb.: 2005; 88. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Коломиец Владислав Михайлович — д.м.н. профессор, зав. кафедрой фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет Минздрава России

Абрамов Алексей Вячеславович — зам. главного врача Областного клинического противотуберкулёзного диспансера Комитета здравоохранения Курской области

Рачина Наталья Владимировна — ассистент кафедры фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет Минздрава России

Рублева Наталья Владимировна — к.м.н., ассистент кафедры фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет Минздрава России

Фармакоэкономический анализ использования гепатопротекторов в лечении лекарственного поражения печени после химиотерапии лимфомы Ходжкина

Д. Д. МОРИКОВ¹, Е. Г. МОРИКОВА², В. В. ДВОРНИЧЕНКО³

¹ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, Иркутск

² Корпорация «Иркут», Иркутск

³ Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск

Pharmacoeconomic Analysis of the Use of Hepatoprotectors in Management of Drug-Associated Liver Injury Due to Hodgkin's Lymphoma Chemotherapy

D. D. MORIKOV, E. G. MORIKOVA, V. V. DVORNICHENKO

Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk

Irkut Corporation, Irkutsk

Irkutsk State Medical University, Irkutsk

В работе представлены данные фармакоэкономического исследования применения Ремаксола в лечении лекарственного поражения печени, возникающего после химиотерапии онкологических больных. Исследование проводилось по методу «затраты — эффективность» в двух группах сравнения, распределённых по способу лечения лекарственного поражения печени. Исследование показало экономическую выгоду применения Ремаксола.

Ключевые слова: фармакоэкономика, Ремаксол, прямые затраты, эффективность.

The data on the pharmacoeconomic research of the use of Remaxol in treatment of drug-associated liver injury due to the chemotherapy in cancer patients are presented. The costs-efficiency method was applied to two groups of the patients with drug-associated liver injury treated according to different schemes. The research showed economical benefits of the Remaxol use.

Key words: pharmacoeconomics, Remaxol, direct costs, efficiency.

Введение

На настоящий момент наиболее эффективным методом лечения лимфомы Ходжкина является полихимиотерапия (ПХТ) [1, 2]. Проведение эффективной, интенсифицированной химиотерапии в 10% случаев ограничивается токсическим воздействием высоких доз цитостатиков, которые обладают выраженным негативным влиянием на печень, повышающим риск развития тяжёлой печеночной недостаточности, приводящей к летальному исходу [3].

Применяемые с целью профилактики и лечения лекарственного поражения печени (ЛПП) гепатопротекторы, несмотря на их разнообразие, остаются недостаточно эффективными. Чаще всего при ЛПП в онкологии используется сочетание гептрала и эссенциале Н.

Исходя из этого, целью настоящей работы являлось исследование фармакоэкономической эффективности применения гепатопротектора Ремаксола в лечении токсического ЛПП у больных лимфомой Ходжкина.

Материал и методы

В ретроспективном сравнительном клиническом исследовании больные были разделены на две группы в зависимости от способа коррекции печеночной недостаточности на этапе ПХТ:

— основная группа (ОГ) — больные ($n=25$), получившие лечение с использованием Ремаксола в интенсивной терапии ЛПП;

— группа клинического сравнения (ГКС) — больные ($n=25$), получившие лечение побочных эффектов химиотерапии с использованием эссенциале Н и гептрала.

Исследуемые группы были сопоставимы по возрасту, полу и тяжести ЛПП. Клинические исследования показали, что терапия в ОГ оказалась более эффективной, по сравнению с ГКС. Уровни трансаминаз в ОГ достигли референтных значений к пятым суткам терапии, тогда как в ГКС только к седьмым суткам проводимого лечения.

Был проведён фармакоэкономический анализ по методу «затраты — эффективность» (cost — effectiveness analysis/CEA) [4]. За единицу эффекта, полученного в результате лечения ЛПП, в нашей работе выбрано количество дней, необходимых

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 664079, Сибирский федеральный округ, Иркутская область, гор. Иркутск, микрорайон Юбилейный, д. 100. Кафедра анестезиологии и реаниматологии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования

Таблица 1. Стоимость лекарственных средств и услуг для лечения ЛПП в ОГ и ГКС

Группа больных	Показатель	Лекарственные средства			Показатель	Услуги	
		Ремаксол (фл. 400 мл)	Эссенциале (амп. 5 мл)	Гентрал (фл. 400 мг)		в/в капельные инъекции	в/в струйные инъекции
ОГ	Количество дней назначения	5			Частота предоставления	10	
	ОДД, фл/ЭКД, фл	2/10			Среднее количество	10	
	ОДД, руб.	532,18			Цена, руб.	385,00	
	ЭКД, руб.	2660,90			Стоимость руб.	3850,00	
ГКС	Количество дней назначения		7	7	Частота предоставления		42
	ОДД, мг/ЭКД, мг		1000/ 7000	800/5600	Среднее количество		42
	ОДД, руб.		520,28	660,00	Цена, руб.		120,00
	ЭКД, руб.		3641,96	4620,00	Стоимость руб.		5040,00

Примечание. ОДД — ориентировочная дневная доза; ЭКД — эквивалентная курсовая доза.

для купирования высокого уровня трансаминаз. Затраты выражены в рублях. Анализ «затраты — эффективность» проведён в два этапа.

Первый этап заключался в анализе результатов медицинских вмешательств в ОГ и ГКС и имел целью определение прямых медицинских затрат на одного больного на основе данных о стоимости препаратов и лечебных манипуляций на курс лечения по каждой из методик с учётом среднего веса больного (60 кг). Для расчёта затрат на медицинские услуги использованы тарифы платных услуг по оказанию медицинской помощи и прейскурант цен на лекарственные препараты аптеки ГБУЗ «Областной онкологической диспансер» г. Иркутска на начало 2012 года.

Стоимость курса лечения цитолитического синдрома в группах сравнения рассчитана путём суммирования стоимости лечебных манипуляций и стоимости лекарственных средств.

Стоимость услуги рассчитывалась по формуле:

$$Y = C \times \text{Ч},$$

где Y — затраты на предоставление услуги, C — стоимость услуги, Ч — частота предоставления услуги.

Стоимость ориентировочной дневной дозы была рассчитана по формуле:

$$\text{ОДД} = C / (N \times n) \times K,$$

где ОДД — стоимость ориентировочной дневной дозы, C — стоимость упаковки препарата, N — количество таблеток (ампул) в упаковке, n — количество миллиграмм в таблетке (ампуле), K — количество миллиграмм в ориентировочной дневной дозе.

Стоимость эквивалентной курсовой дозы была рассчитана по формуле:

$$\text{ЭКД} = C / (N \times n) \times K,$$

где ЭКД — стоимость эквивалентной курсовой дозы, C — стоимость упаковки препарата, N — количество таблеток (ампул) в упаковке, n — количество миллиграмм в таблетке (ампуле), K — количество миллиграмм в эквивалентной курсовой дозе.

Общие прямые/средние затраты на лечение ЛПП у одного пациента в ОГ либо в ГКС рассчитывались следующим образом:

$$\text{ДСОГ(ГКС)} = (\text{ДСОГ(гкс)} \times P) / P,$$

где ДСОГ(ГКС) — общие прямые/средние затраты на лечение пациента в ОГ, либо в ГКС без осложнений, ДСОГ(гкс) — прямые затраты на курс лечения ЛПП в ОГ, либо в ГКС, P — количество случаев.

Второй этап оценки по критерию «затраты — эффективность» заключался в расчёте экономической эффективности затрат. Главная цель данного этапа — сравнение затрат на единицу эффекта (день), получаемого в результате использования двух альтернативных методов лечения в ОГ и ГКС при помощи коэффициента эффективности. По результатам

исследования была выявлена наиболее эффективная с точки зрения фармакоэкономики методика лечения ЛПП.

Расчёт коэффициента проводился по формуле:

$$\text{CEA} = C / E_f,$$

где CEA — соотношение «затраты/эффективность», C — затраты на лечение одного пациента, E_f — эффективность лечения (вероятность достижения эффекта по выбранному критерию эффективности).

Расчёт показателя приращения эффективности затрат проводился по формуле:

$$\text{CEA}_{\text{incr}} = (C_1 - C_2) / (E_{f1} - E_{f2}),$$

где CEA_{incr} — показатель приращения эффективности затрат (показывает величину дополнительных вложений, необходимых для достижения дополнительного эффекта), C₁ и C₂ — затраты при первой и второй схемах лечения (ΔРасходы), E_{f1} и E_{f2} — эффективность при первой и второй схемах лечения соответственно (ΔЭффект).

На заключительном этапе рассчитывали экономию денежных средств при применении менее затратной методики (ΔC) как разницу между стоимостями использования более затратной и менее затратной терапии (C_{high} и C_{low} соответственно) по формуле ΔC = C_{high} — C_{low} и упущенные возможности при применении более затратной терапии (Q) по формуле: Q = ΔC / C_{low}.

Упущенные возможности, рассчитанные на этапе сравнительной оценки экономической эффективности различных оригинальных методик, показывают, сколько дополнительно пациентов на один курс терапии ЛПП можно пролечить при переходе на менее затратный метод.

Результаты и обсуждение

Стоимость проведения лечебных манипуляций и лекарственных средств в зависимости от длительности терапии представлены в табл. 1.

Стоимость курса терапии ЛПП в ОГ составила 2660,90 + 3850,00 = 6510,90 руб. на одного человека. Стоимость курса терапии цитолитического синдрома в ГКС составила 3641,96 + 4620,00 + 5040,00 = 13301,96 руб. на одного человека.

Расчёт общих прямых затрат на лечение ЛПП в группах сравнения на курс ПХТ представлен в табл. 2.

Расчёты показали, что лечебный эффект ремаксоло достигнут меньшими (6510,90 руб.), чем при стандартной терапии (13301,96 руб.) затратами. Экономия при использовании ремаксоло составила 6791,06 руб.

Таблица 2. Стоимость лечения пациентов на курс ПХТ в исследуемых группах

Параметры	ОГ (n=25)	ГКС (n=25)
Стоимость препаратов для лечения цитолитического синдрома, руб.	66522,50	206549,00
Стоимость услуг для лечения цитолитического синдрома, руб.	96250,00	126000,00
Итого:	162772,5	332549,00
Общие прямые/средние затраты на лечение 1 пациента, руб.	6510,90	13301,96
Величина экономии, руб.	6791,06	
Общие прямые/средние затраты на лечение 100 пациентов, руб.	651090,00	1330196,00
Величина экономии, руб.	679106,00	

Следующий этап, расчёт эффективности затрат или стоимостного анализа эффективности (СЕА — cost-effectiveness analysis), проведён в ОГ и ГКС. Мы сравнили затраты на единицу эффекта (день), получаемого в результате лечения в ОГ и ГКС с использованием разных методик.

Курс лечения в ГКС при общих затратах в 13301,96 руб. на протяжении одного курса ПХТ снизил уровень трансаминаз в среднем за 7 дней. Курс лечения в ОГ при общих затратах в 6510,90 руб. на протяжении одного курса ПХТ снизил уровень трансаминаз в среднем за 5 дней.

Показатели соотношения «затраты — эффективность» составили в расчёте на 1 пациента в ГКС 1900,28 рубля (100 пациентов — 190028,00 руб.) на 1 единицу эффективности (13301,96/7); в расчёте на 1 пациента в ОГ 1302,18 руб. (100 пациентов — 130218,00 руб.) на 1 единицу эффективности (6510,90/5).

Расчет приращения эффективности затрат по группам сравнения выглядит следующим образом: $CEA_{incr} = (13301,96 - 6510,90) / (7 - 5)$, где 6791,06 — это Δ расходы, 2 — это Δ эффект, 3395,53 — CEA_{incr} — приращение эффективности затрат.

Итог расчётов показал, что для достижения ещё одной дополнительной единицы эффективности лечения одного пациента потребуется в ГКС дополнительно затратить 3395,53 рубля.

Приращение затрат на единицу эффективности составляет 3395,53 рубля, это показывает, что при расширении использования препаратов эссенциале и гептрала следует ожидать прирост затрат в размере 3395,53 рубля на каждую дополнительную единицу эффективности. Однако при условии их использования клиническая эффективность ниже, чем при использовании ремаксола.

При расчёте усреднённых показателей (средняя стоимость лечения — 9906,43 рубля, средняя клиническая эффективность — 6 дней и среднее соотношение «затраты — эффективность» — 1651,07 рубля на одну дополнительную единицу эффективности) установлено, что при лечении

пациентов с ЛПП ремаксолом эффективность больше в 1,2 раза (6 дн./5 дн.), чем средняя, а соотношение «затраты — эффективность» меньше на 348,89 руб. (1651,07—1302,18), чем среднее значение.

На заключительном этапе рассчитаем упущенные возможности при применении более затратной терапии (Q) как отношение разницы между стоимостями более затратной и менее затратной терапии ΔC (13301,96—6510,90=6791,06 руб.) и менее затратной терапии (C_{low} , равной 6510,90 руб.): $Q = 6791,06 / 6510,90$.

Показатель упущенных возможностей, равный 1,04, означает, что переход на менее затратный метод позволит сэкономить средства системы здравоохранения и в рамках выделенного бюджета пролечить больше пациентов (на 104%).

Выводы

1. Интенсивная терапия с использованием ремаксола при лечении лекарственных поражений печени, возникших после курса химиотерапии, с клинической и экономической точки зрения выгодна.
2. Эффект от проводимой терапии ремаксолом достигается быстрее в 1,4 раза, чем при использовании стандартных методов, что позволяет своевременно компенсировать уровень трансаминаз (а в сравнении со средними показателями — быстрее в 1,2 раза).
3. Сравнение затрат на проведение интенсивной терапии с использованием ремаксола показало преимущество использования данного препарата. Затраты на один день лечения ЛПП с применением ремаксола меньше на 31,5%, чем с использованием эссенциале и гептрала (а в сравнении со средними показателями — меньше на 18,7%).
4. Расчёт «упущенных возможностей» показал, что перераспределение средств в рамках выделенного бюджета в пользу Ремаксола позволит на 104% увеличить дополнительное количество пролеченных пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демина Е. А. Злокачественные опухоли. 2013; 2: 18—22. / E.A. Demina, Zlokachestvennye opuholi. 2013; 2: 18—22. [in Russian]
2. Шкляев С.С., Павлов В.В. Клинико-онкогематол 2013; 2: 6: 139—147. / Shkljaev S.S., Pavlov V.V. Klin onkogematol 2013; 2: 6: 139—147. [in Russian]
3. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний 2-е изд. / Н. И. Переводчикова (ред.) Практическая медицина, М.: 2005. / Rukovodstvo po himioterapii opuholevyh zabolevanij 2-e izd. / N. I. Perevodchikova (red.) Prakticheskaja medicina, M.: 2005. [in Russian]
4. Применение клинико-экономического анализа в медицине. Учебное пособие / А.В. Решетников (ред.), ГЭОТАР-Медиа, М.: 2009. / Primenenie kliniko-jekonomicheskogo analiza v medicine. Uchebnoe posobie / A.V. Reshetnikov (red.), GJeOTAR-Media, M.: 2009. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Морилов Дмитрий Дмитриевич — к.м.н., ассистент кафедры анестезиологии и реаниматологии ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», Иркутск

Морилова Е.Г. — финансовый отдел ИАЗ — филиал ПАО «Корпорация «Иркут», Иркутск

Дворниченко В.В. — д.м.н., Кафедра онкологии и лучевой терапии ГОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск

Направленное выделение актиномицетов редких родов из почвы

О. Н. СИНЁВА, Л. П. ТЕРЕХОВА

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

Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Soil

O. N. SINEVA, L. P. TEREKHOVA

G. F. Gause Research Institute of New Antibiotics, Moscow

В процессе поиска продуцентов биологически активных соединений, а также в экологических исследованиях применяется большое разнообразие методов селективного выделения актиномицетов. В обзоре рассмотрены методы выделения актиномицетов редких родов из почвы.

Ключевые слова: актиномицеты, редкие роды, методы, выделение.

Many diverse methods for selective isolation of actinomycetes are used in discovery of organisms producing biologically active substances, as well as in ecological studies. Methods for isolation of rare actinomycetes from soil are reviewed.

Key words: actinomycetes, rare genera, methods, isolation.

Актиномицеты — обширная группа грамположительных мицелиальных бактерий, принадлежащая к филуму *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales* [1]. Актиномицеты являются продуцентами биологически активных соединений, среди которых выделены вещества, обладающие антибактериальным, антигрибковым, противоопухолевым действием, и соединения, подавляющие развитие возбудителей паразитарных заболеваний. Изучено более 16000 антибиотиков микробного происхождения, продуцентами более 50% из них являются актиномицеты. Около 74% антибиотиков актиномицетного происхождения выделено из рода *Streptomyces*, остальная часть — из представителей редких родов (*Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Saccharopolyspora*, *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*) [2].

Редкими принято называть актиномицеты, не относящиеся к роду *Streptomyces*. По сравнению со стрептомицетами, культуры редких родов актиномицетов трудно выделяются из природных источников, сложны в культивировании и хранении при обычных условиях. Актиномицеты редких родов продуцируют большое количество разнообразных, уникальных, иногда очень сложных соединений, показывающих высокую антибактериальную активность и часто низкотоксичных [2]. Метаболиты

редких актиномицетов имеют очень важное практическое значение для медицины: антибиотики широкого спектра действия из группы аминогликозидов — гентамицин, сизомицин (*Micromonospora*) и тобрамицин (*Streptoalloteichus*); противотуберкулезный антибиотик рифамицин из группы анзамидов (*Amiclatopsis*); полициклические гликопептиды ристомицин, ванкомицин (*Amiclatopsis*) и тейкопланин (тейхомицин) (*Actinoplanes*); макролидные антибиотики эритромицин (*Saccharopolyspora*) и розамицин (*Micromonospora*); противоопухолевый антибиотик карминомицин (*Actinomadura*) [3, 4]. Такие применяемые в сельском хозяйстве соединения, как зирацин, далбавацин, спинозин, также продукты редких родов актиномицетов [2].

Представители почти всех известных родов актиномицетов выделены из почвы. Знание закономерностей распределения актиномицетов в почвах очень важно для направленного выделения определённых групп актиномицетов. Так, низкие значения pH лесных подзолистых почв способствуют развитию в них представителей рода *Streptosporangium*, наиболее благоприятными местом обитаниями для олигоспоровых актиномицетов (*Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Microbispora*, *Thermomonospora*) в хвойных лесах оказались нижние слои подстилки и верхний горизонт почвы, обогащённые растительными остатками. В почвах степных биогеоценозов доминантами, кроме представителей рода *Streptomyces*, являются представители родов

© О. Н. Синёва, Л. П. Терехова, 2015

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБНУ НИИНА

Micromonospora, *Actinomadura*, *Nocardia*, меньшую долю составляют представители родов *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Streptosporangium* [5].

Для выделения представителей редких родов из мест их естественного обитания широко применяются методы селективной изоляции. Эти методы основаны на различиях в питательных потребностях, физиологических свойствах, спектрах чувствительности к антибиотикам и другим ингибиторам роста у разных групп микроорганизмов.

Селективная изоляция с помощью антибиотиков

Антибиотики, добавленные в питательные среды для выделения актиномицетов, ингибируют рост сопутствующих грибов, немикелиальных бактерий и быстро растущих актиномицетов наиболее распространённого рода *Streptomyces* и тем самым создают благоприятные условия для роста и выделения медленно растущих редких культур. В качестве селективных агентов широко используют антибиотики: канамицин, рифампицин, рубомицин, стрептомицин, брунеомицин, новобиоцин, нистатин и др. Установлено, что различные антибиотики, используемые в качестве селективных агентов, обеспечивают преимущественное выделение определённых родов или групп родов актиномицетов. Например, рубомицин наиболее благоприятен для выделения культур рода *Actinomadura*, на среде со стрептомицином преобладают культуры нокардиального типа, новобиоцин способствует преимущественному выделению микромоноспор. Тобрамицин, антибиотик группы аминогликозидов, способствует выделению культур родов *Micromonospora*, *Amiclatopsis*, *Streptosporangium*, *Saccharotrix* [6].

Для выделения редких родов актиномицетов применяют также комбинации различных типов антибиотиков. Использование смеси канамицина, норфлоксацина и налидиксовой кислоты позволило выделить *Microtetraspora* spp. [7] смеси фрадомицина, канамицина, налидиксовой кислоты и триметоприма — *Acinetospora* spp. [8]; смеси канамицина, йозомицина, налидиксовой кислоты и лизоцима — *Actinomadura viridis* [9].

Предварительное изучение чувствительности штаммов различных родов актиномицетов к ингибитору роста (антибиотику) позволяет определить с большой долей вероятности, какие таксономические группы можно выделять с применением данного вещества и в каких концентрациях его необходимо использовать. Так, например, после сравнительного изучения чувствительности к ряду антибиотиков коллекционных и свежевыделенных культур разных видов, относящихся к роду *Actinomadura*, было установлено, что

для направленного выделения лучше всего подходит рубомицин в концентрации 5 мкг/мл [10].

Предварительная обработка природных образцов почвы химическими веществами

Методы предварительной обработки природных образцов почвы химическими веществами широко применяются во всём мире и являются эффективными для селективной изоляции актиномицетов.

Споры стрептомицетов и вегетативные клетки представителей родов *Bacillus* и *Pseudomonas* погибают при действии фенола (1,5%), глюконата хлоргексидина (0,01%) и хлорида бензетония (0,01%) в течение 30 мин при 30°C. В то же время споры культур родов *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Microtetraspora* устойчивы к данным веществам. В связи с этим для селективного выделения вышеперечисленных родов предложена предобработка почвенных суспензий фенолом, глюконатом хлоргексидина и хлоридом бензетония [11].

Предобработка почвы 1% раствором хлорамина Т с последующим высевом на HV-агар позволяет селективно выделять актиномицеты родов, принадлежащих семейству *Streptosporangiaceae* (*Microbispora*, *Microtetraspora*, *Streptosporangium*, *Herbidospira*) [12].

Хлорамин Б обладает микробицидным действием в отношении широкого круга организмов, являясь сильным окислителем. Хлорноватистая кислота, выделяющаяся при реакции хлорамина Б с водой, оказывает дополнительный антимикробный эффект [13]. Для выделения олигоспоровых актиномицетов родов *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Actinomadura*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* была предложена предобработка почвенных образцов растворами хлорамина Б [14].

Tsao с соавторами был разработан метод выделения актиномицетов из почвы, который заключался в инкубации образцов почвы с карбонатом кальция [15]. Более поздние исследования показали, что ионы кальция играют значительную роль в дифференциации актиномицетов: они влияют на способность образовывать воздушный мицелий [16]. В научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе этот метод был модифицирован: глюкозо-соевая среда была заменена органическим агаром 2 Гаузе, так как он прозрачен и на нем развивались более крупные колонии, также был изменён метод посева — с глубинного на поверхностный [17]. Используемый метод обработки почвы карбонатом кальция во влажных условиях позволил увеличить количество выделенных актиномицетов разных родов, в том числе и редких:

Actinomadura, *Micromonospora*, *Amycolatopsis*, *Nocardiosis*, *Nocardoides*, *Promicromonospora*, *Streptosporangium*.

Дрожжевой экстракт и додецилсульфат натрия являются активаторами прорастания спор актиномицетов, а раствор фенола — ингибитором нежелательной микрофлоры. При обработке данными веществами почвенной суспензии существенно увеличивается количество культур рода *Streptosporangium* [18].

Таким образом, различные химические вещества оказывают как стимулирующее, так и ингибирующее действие на микрофлору почвы. Применение комбинаций химических веществ при обработке природных субстратов приводит к высокой селективности выделения определённых таксонов актиномицетов.

Методы, основанные на явлении хемотаксиса

Для культур родов *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* и некоторых других характерно наличие подвижных зооспор, на этом основании были разработаны методы химических «приманок». В качестве аттрактантов были использованы аминокислоты, ароматические соединения и сахара. Результаты показали, что γ -коллин является универсальным аттрактантом для выделения актиномицетов, принадлежащих к родам *Actinoplanes* и *Dactylosporangium* [19].

Использование физических факторов для выделения актиномицетов

Для выделения актиномицетов применяют также предварительную обработку природных субстратов физическими факторами.

Среди актиномицетов существуют психрофилы — микроорганизмы устойчивые к низким температурам. Из слоя ледника Антарктиды с глубины 85 метров (имеющего возраст приблизительно 2200 лет) был выделен и описан новый вид *Nocardiosis antarcticus* [20], из антарктического песчаника выделен новый вид *Micromonospora endolithica* [21]. Обнаружены также психротолерантные актиномицеты, принадлежащие к родам *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora* [22]. Среди методов предварительной обработки при помощи низких температур используют метод замораживания — оттаивания, что позволяет выделять из образцов почвы в 1,2—3,6 раза больше актиномицетов, чем из контроля [23].

Кроме психрофилов существует и большая группа термофильных актиномицетов (*Thermomonospora viridis*, *Thermomonospora curvata*, *Thermomonospora fusca*, *Micromonospora chalybeata*, *Actinomadura* sp. и др.) [24—27]. После предвари-

тельной обработки сухим жаром при 100°C почвенных образцов из пещер северного Тайланда выделено 50 видов редких актиномицетов, принадлежащих к родам *Micromonospora*, *Saccharomonospora*, *Nonomuraea*, *Cetellatospora*, *Spirillospora*, *Microtetraspora* и *Saccharotrix* [28].

Известно, что различные группы актиномицетов обладают неодинаковой чувствительностью к ультрафиолетовому (УФ) облучению. О. А. Галатенко и Л. П. Тереховой был разработан метод предварительной обработки почвенной суспензии УФ-облучением. В результате наблюдалось снижение количества выделенных культур, относящихся к роду *Streptomyces*, в то же время культуры редких родов оказались более устойчивыми к УФ-облучению. Наибольшей устойчивостью обладали культуры рода *Micromonospora* [29].

Стимулирующий эффект на прорастание спор микроорганизмов оказывает действие магнитных полей различной мощности [30]. При длительном выдерживании почвенных образцов в магнитном поле (две недели при 28°C), количество выросших актиномицетов увеличилось по сравнению с контролем, с ростом напряжённости магнитного поля ускорялся и рост актиномицетов [31].

Метод концентрирования образцов воды фильтрацией через мембранные фильтры основан на различии размеров спор актиномицетов, грибов и немицелиальных бактерий [32]. Таким же способом были выделены культуры рода *Thermoactinomyces* [33]. Существуют методы, основанные на способности гиф актиномицетов прорасти через поры малого диаметра [34, 35]. Использование фильтров с порами малого диаметра 0,2 мкм позволило полностью исключить рост сопутствующих грибов без применения противогрибковых агентов. С помощью данного метода были выделены актиномицеты таких редких родов, как *Dactylosporangium*, *Catellatospora*, *Catenulispora*, *Lentzea*, *Streptacidiphilus* [36].

С целью десорбции, экстракции спор и мицелия актиномицетов с поверхности частиц природных субстратов применяют обработку образцов ультразвуком [37].

Обработка почвенных образцов волнами КВЧ оказалась эффективной для выделения редких родов актиномицетов. Было показано, что при обработке почвенных суспензий КВЧ-излучением в диапазоне от 3,8 до 5,8 мм, доля одноклеточных бактерий снижалась в два раза, при этом доля выделенных актиномицетов редких родов возрастала в 2 раза. Обработка КВЧ-излучением в данном диапазоне волн оказалась наиболее благоприятной для выделения актиномицетов группы родов *Actinomadura*, *Saccharothrix*, *Nonomuraea*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*. Существенно возросла доля выделенных актиномицетов родов *Actinomadura*, *Microtetraspora* и *Nonomuraea* при

обработке почвенных суспензий КВЧ-излучением в диапазоне волн от 8 до 11,5 мм [38]. При обработке КВЧ почвенных образцов Воронежской области была выделена новая культура *Actinomadura* sp. ИНА 654, которая продуцирует эхиномицин, обладающий противоопухолевым действием. Образование эхиномицина представителем рода *Actinomadura* было обнаружено впервые [39].

Разработаны методы выделения культур редких родов актиномицетов из почвы с применением обработки почвенных образцов СВЧ-волнами и электрическими импульсами. Установлено, что обработка СВЧ-волнами при мощности 80 Вт, времени 30 с приводит к значительному увеличению количества выделенных культур редких родов актиномицетов. К такому же эффекту приводит обработка почвенных образцов электрическими импульсами при напряженности 12 кВ/см в течение 3 мс. Доля актиномицетов в обоих случаях увеличивается в среднем в три раза по сравнению с необработанными образцами [38].

Комплексные методы выделения актиномицетов

Для выделения редких родов актиномицетов в ряде случаев применяют комплексные методы, т. е. предварительную обработку почвенных образцов химическими веществами или физическое воздействие сочетают с последующим высевом образцов на селективные среды.

Олигоспоровые актиномицеты родов *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Microbispora*, *Thermomonospora* являются минорными, но постоянными представителями почвенных актиномицетных комплексов. Для выделения представителей этой группы актиномицетов в качестве предпосевной обработки почвенных образцов применяли прогревание при 120°C для чернозёма и 105°C для торфа в течение 1 часа. Приготовление почвенных суспензий проводили в растворе хлорамина Б. Инкубация посевов проходила при 28°C в течение 3—4 недель. В качестве селективного приёма для выделения из почвы представителей рода *Microbispora* в питательную среду добавляли левомицетин в концентрации 2,5 мг/мл, что приводило к увеличению численности микробиспор на 3—4 порядка [40].

Обработка почвенного образца сухим жаром при температуре 110°C в течение 15 мин и посев на среду с антибиотиками привели к селективной изоляции актиномицетов рода *Actinobispora* [41].

Для выделения актиномицетов рода *Planomonospora* использовали обработку почвы раствором снятого молока в N-циклогексил-2-амино-этансульфоновой кислоте (рН 9,0) и двукратное центрифугирование [42].

Культуры рода *Actinopolymorpha* были выделены также с использованием комплексного метода: почву помещали в богатую среду с двумя антибиотиками (пенициллином и стрептомицином), затем инкубировали, центрифугировали и промывали [43].

Для выделения зооспор актиномицетов родов *Actinoplanes* и *Dactylosporangium* применяли выдерживание почвенного экстракта в течение 90 мин при температуре 30°C в фосфатном буфере. Последующее центрифугирование при 1500 об/мин в течение 20 мин позволило устранить актиномицеты рода *Streptomyces* и представителей других «неподвижных» родов актиномицетов. Добавление в питательную среду (НВ-агар) налидиксовой кислоты и триметоприма ингибировало рост грамотрицательных бактерии и бактерии рода *Bacillus*. Кроме актиномицетов родов *Actinoplanes* и *Dactylosporangium*, с помощью данного метода были выделены культуры таких родов, как *Actinokineospora*, *Catenuloplanes* и *Kineospora* [44].

Предобработка почвенных суспензий ультразвуком в сочетании с обработкой фенолом (1,5%) и/или сухим жаром (100°C) в течение 1 ч и высевом на питательные среды, содержащие антибиотики (циклогексимид, нистатин, налидиксовая кислота), способствует селективному выделению представителей рода *Micromonospora* [45].

Выделение актиномицетов с использованием биологических факторов

Важной группой методов как для выявления актиномицетов в почве, так и для селективного выделения являются методы с использованием фагов.

Для выделения культур редких родов актиномицетов применяют стрептофаги, лизирующие колонии культур рода *Streptomyces*. Уменьшение количества стрептомицетов приводило к увеличению количества актиномицетов редких родов. Интенсивный лизис стрептомицетальных колоний не изменялся в течение длительного инкубационного периода, который необходим для роста других родов актиномицетов [46]. Кроме фагов, активных в отношении колоний актиномицетов, существуют фаги, лизирующие колонии немицелиальных бактерий, что также позволяет увеличить количество выделяемых актиномицетов [46, 47].

Сукцессионный подход к выделению актиномицетов из почвы

Под сукцессией понимают последовательную смену биогеоценозов, преемственно возникающих в одном и том же биотопе под влиянием как

внешних воздействий, так и накопления внутренних противоречий развития самих биогеоценозов [48]. В почве происходит последовательная смена микробных сообществ, которая имеет сезонный характер. Когда число факторов, определяющих структуру системы, невелико, т. е. система «молодая», в ней преобладает ограниченное количество так называемых R-стратегов, организмов с высокой скоростью размножения. Со временем в действие вступает всё больше экологических факторов, поскольку сама среда в результате развития организмов становится более разнородной. На поздних этапах в «зрелой» системе возрастает разнообразие организмов, выравнивается численность разных популяций за счёт того, что R-стратегов становится меньше, а количество K-стратегов, медленно растущих организмов с повышенной конкурентоспособностью, увеличивается. Эти две стратегии сопоставляются с обилием субстрата [49].

В настоящее время установлено, что на определённых этапах сукцессии редкие роды актиномицетов могут иметь равную со стрептомицетами долю в актиномицетном комплексе, а иногда и доминировать в нём. Сукцессионные изменения в комплексе актиномицетов существенно зависят от влажности почв, т. е. в одной и той же почве микробная сукцессия может развиваться по-разному. Более высокие значения плотности популяции для стрептомицетов зарегистрированы при небольшом увлажнении почвы, тогда как для микромоноспор и сахаромоноспор, в большинстве случаев, относительные максимумы зарегистрированы при полевой влагоёмкости почвы -1 и -5 Мпа. Периоды максимального обилия для представителей постоянно выделяющихся из почвы четырех родов актиномицетов — *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, *Saccharomonospora* отмечены на разных этапах сукцессии, что позволяет установить наиболее благоприятные периоды и условия для выделения представителей конкретных таксонов [50].

При исследовании динамики олигоспоровых актиномицетов в ходе сукцессии, инициированной увлажнением чернозёма, были выявлены наиболее благоприятные для их выделения временные промежутки и условия сукцессии. Установлено, что представителей родов, предварительно идентифицированных как *Microbispora* и *Saccharopolyspora*, лучше выделять на ранних (7 сут. после инициации сукцессии) и поздних (42 сут.) этапах сукцессии [51].

Следовательно, использование сукцессионного подхода в сочетании с методами посева позволяет обнаружить представителей редких родов актиномицетов и определить временные проме-

жутки, обеспечивающие максимальную плотность их популяций в почве.

Методы выделения с использованием веществ животного и растительного происхождения

Отдельного внимания заслуживают методы выделения с помощью веществ животного и растительного происхождения. В исследовании С. Н. Филипповой с соавторами было показано, что гормональные соединения из группы катехоламинов — дофамин и адреналин стимулируют прорастание спор и стабилизируют популяционный состав штаммов-продуцента эритромицина *Saccharopolyspora erythraea* [52]. Исходя из этих данных, можно было предположить, что адреналин будет оказывать стимулирующее действие на прорастание спор других родов актиномицетов.

В более поздних исследованиях было показано, что добавление в питательную среду веществ из группы катехоламинов (адреналин) и ауксинов (гетероауксин) для активации прорастания спор, существенно увеличивает долю выросших актиномицетов, в том числе возрастает численность и разнообразие выделенных культур редких родов актиномицетов [53].

Как известно, сок и листья алоэ широко используют в народной и традиционной медицине. Сок алоэ содержит эфирные масла, около 20 аминокислот, витамины В, С, Е, бета-каротин, клетчатку и другие питательные ферменты и микроэлементы, кроме того, он обладает бактерицидным и регенерирующим действием. В наших исследованиях было показано, что предварительная обработка в течение 10 мин и 1 ч почвенных суспензий соком алоэ в концентрациях 10 и 50% приводила к увеличению количества выросших актиномицетов в опытных вариантах по сравнению с контролем, в том числе возрастала и доля выросших колоний редких родов актиномицетов [54].

Подводя итог обзору литературы, следует подчеркнуть, что, несмотря на большое количество существующих работ по селективному выделению актиномицетов из почвы, разработка новых методов является актуальной. Исследования, основанные на секвенировании ДНК, экстрагированной из почвенных образцов, показали, что в почве содержится огромное количество бактериальных геномов, которые отличаются и во много раз превышают разнообразие тех организмов, которые выделяются в чистую культуру, т.е. в лабораторных условиях выделена лишь незначительная часть микроорганизмов, существующих в природе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F. Douve van sinderen genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Molec Biol Reviews* 2007; 71: 3: 495–548.
2. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 2005; 58: 1: 1–26.
3. Терехова Л.П., Галатенко О.А., Преображенская Т.П. [2] Антибактериальные антибиотики из культур редких родов актиномицетов. Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. *Алма-Ата: Гылым*, 1990; 70–75. / Terехova L.P., Galatenko O.A., Preobrazhenskaja T.P. [2] Antibakterial'nye antibiotiki iz kul'tur redkih rodov aktinomycetov. Poisk producentov antibiotikov sredi aktinomycetov redkih rodov. *Alma-Ata: Gylym*, 1990; 70–75. [in Russian]
4. Tiwari K., Gupta R.K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit Rev Biotechnol* 2012; 32: 108–132.
5. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.Л., Зенова Г.М. Биология почв. М.: МГУ. 2005; 362. / Zvjaginseva D.G., Bab'eva I.L., Zenova G.M. *Biologija pochv*. M.: MGU 2005; 362. [in Russian]
6. Терехова Л.П., Галатенко О.А., Алферова И.В., Преображенская Т.П. Использование селективных сред для выделения актиномицетов. Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. *Алма-Ата: Гылым*, 1990; 5–13. / Терехова Л.П., Галатенко О.А., Алферова И.В., Преображенская Т.П. Использование селективных сред для выделения актиномицетов. Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. *Алма-Ата: Гылым*, 1990; 5–13. [in Russian]
7. Hayakawa M., Momose Y., Yamazaki T. A method for the selective isolation of *Microtetraspora glauca* and related four-spored actinomycetes from soil. *J Appl Bacteriol* 1996; 80: 4: 375–386.
8. Otaguro M., Hayakawa M., Yamazaki T., Jimura Y. An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinocineospora* spp. In soil and plant litter. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91: 1: 118–130.
9. Hayakawa M., Momose Y., Kajiura T., Yamazaki T., Tamura T., Hatano K., Nonomura H. A selective isolation method for *Actinomadura viridis* in soil. *J Ferment Bioeng* 1995; 79: 287–289.
10. Терехова Л.П., Галатенко О.А., Преображенская Т.П. Образование антибиотиков культурами рода *Actinomadura*. Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. *Алма-Ата: Гылым*, 1990; 76–82. / Terехova L.P., Galatenko O.A., Preobrazhenskaja T.P. Obrazovanie antibiotikov kul'turami roda *Actinomadura*. Poisk producentov antibiotikov sredi aktinomycetov redkih rodov. *Alma-Ata: Gylym*, 1990; 76–82. [in Russian]
11. Hayakawa M. Selective isolation of rare actinomycete genera using pretreatment techniques. Selective isolation of rare *Actinomycetes* / Eds. Kurtböke I. Australia: Queensland Complete Printing Services, 2003; 56–82.
12. Hayakawa M., Iino H., Takeuchi S., Yamazaki T. Application of method incorporating treatment with chloramine-T for the selective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil. *J Ferment Bioeng* 1997; 84: 559–602.
13. Красильников А.П. Справочник по антисептике. Минск: Высшая школа, 1995; 368. / Krasil'nikov A.P. *Spravochnik po antiseptike*. Minsk: Vysshaja shkola, 1995; 368. [in Russian]
14. Михайлова Н.В. Выявление олигоспоровых актиномицетов с применением предобработки хлорамином Б. Проблемы экологии и физиологии микроорганизмов: К 110-летию со дня рож. проф. Е.Е. Успенского. Научн. конф., 21 дек., 1999. Москва, МГУ. М.: 2000; 79. / Mihajlova N.V. Vyjavlenie oligosporovyh aktinomycetov s primeneniem predobrabotki hloraminom B. Problemy ekologii i fiziologii mikroorganizmov: K 110-letiju so dnja rozhd. prof. E.E. Uspenskogo. Nauchn. konf., 21 dek., 1999. Moskva, MGU. M.: 2000; 79. [in Russian]
15. Tsao P.H., Leben C., Keit G.W. An enrichment method for isolation actinomycetes that produce diffusible antifungal antibiotics. *Phytopathology* 1960; 50: 81–91.
16. Natsume M., Yasui K., Marumo S. Calcium ion as a regulator of aerial mycelium formation in actinomycetes. Abstracts 7th International Symposium on Biology of Actinomycetes. Tokyo. 1988; 107.
17. Алферова И.В., Терехова Л.П. Применение метода обогащения почвы карбонатом кальция с целью выделения актиномицетов. Антибиотики и химиотер 1988; 33: 12: 888–889. / Alferova I.V., Terехova L.P. Primenenie metoda obogashhenija pochvy karbonatom kal'cija s cel'ju vydelenija aktinomycetov. Antibiotiki i himioter 1988; 33: 12: 888–889. [in Russian]
18. Agrawal P., Goodfellow M. Selective isolation and characterization of members of the family *Streptosporangiaceae*. *Actinomycetes*. 1990; 1: 2: 48.
19. Hayakawa M., Tamura T., Nonomura H. Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using γ -collidine as the chemoattractant. *J Ferment Bioeng* 1991; 72: 6: 426–432.
20. Абзюзов С.С., Филиппова С.Н., Кузнецов В.Д. *Nocardopsis antarcticus* — новый вид актиномицета, выделенный из толщи ледника Центральной Антарктики. Изв АН СССР. Сер Биол 1983; 4: 559–569. / Abzuzov S.S., Filippova S.N., Kuznecov V.D. *Nocardopsis antarcticus* — novyj vid aktinomyceta, vydelennyy iz tolshhi lednika Central'noj Antarktiki. Izv AN SSSR. Ser Biol 1983; 4: 559–569. [in Russian]
21. Hirsch C.F., Christensen D.L. A novel method for selective isolation of actinomycetes. Annual Meeting ASM: Abstr 1982; 112–113.
22. Xu L., Li Q., Jiang C. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Appl Env Microbiol* 1996; 62: 244–248.
23. Anghelescu L., Dobrota S., Popescu A. Comparative considerations on methods and media used for the isolation of actinomycetes from the soil. *Symp Soil Biol*, 6-th: Abstr. Bucuresti. 1977; 59–66.
24. Takahashi K., Totsuka A., Nakakuki T., Nakamura N. Production and application of a maltogenic amylase by a strain of *Thermomonospora viridis* TF-35. *Starch Staerke* 1992; 44: 96–101.
25. Ethier J.F. Cloning of two xylanase genes from the new isolated actinomycetes *Actinomadura* sp. strain FC 1 and characterization of the gene product. *Canad J Microbiol* 1994; 40: 5: 362–368.
26. Stutzenberger F. Extracellular enzyme production by *Thermomonospora curvata* grown on bagasses. *J Industrial Microbiol* 1994; 13: 1: 35–42.
27. Gallagher J., Winters A., Barron N., Mchale L., Mchale A.P. Production of cellulase and β -glucosidase activity during growth of actinomycete *Micromonospora chalybeata* on cellulose-containing media. *Biotechnol Lett* 1996; 18: 5: 537–540.
28. Lumyong S., Nakaew N., Pathom-agree W., Lumyong P. Phylogenetic analysis of rare actinomycetes from cave soils in northern Thailand and their antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae* and MRSA. *Int Symp Biol Actinomycetes*. 14-th: Abstr. 2007; 126.
29. Галатенко О.А., Терехова Л.П., Преображенская Т.П. Применение метода облучения почвенных образцов ультрафиолетом для выделения актиномицетов редких родов. Поиск продуцентов антибиотиков среди актиномицетов редких родов. *Алма-Ата: Гылым*, 1990; 29–35. / Galatenko O.A., Terехova L.P., Preobrazhenskaja T.P., Primenenie metoda obluchenija pochvennyh obrazcov ul'trafioletom dlja vydelenija aktinomycetov redkih rodov. Poisk producentov antibiotikov sredi aktinomycetov redkih rodov. *Alma-Ata: Gylym*, 1990; 29–35. [in Russian]
30. Давидков Д.С., Данилов В.И., Пейкова С.П. Культивирование дрожжей в магнитном экране. Труды Объед. ин-та ядер исслед. Дубна. 1983; 19: 8. / Davidkov D.S., Danilov V.I., Pejкова S.P. Kul'tivirovanie drozhzhev v magnitnom jekrane. Trudy Ob'ed. in-ta jader issled. Dubna. 1983; 19: 8. [in Russian]
31. Павлович С.А. Способ выращивания актиномицетов А.с. СССР. 200122. Б.и. 1979; 36: 43. / Pavlovich S.A. Sposob vyrashhivaniya aktinomycetov A.s. SSSR. 200122. B.i. 1979; 36: 43. [in Russian]
32. Polsinelli, Mazze P.G. Use of membrane filters for the selective isolation of actinomycetes from soil. *FEMS Microbiol Lett* 1984; 22: 79–83.
33. Al-Diwany L.J., Unsworth B.A., Cross T.J. A comparison of membrane filters for counting *Thermoactinomyces endosporus* in spore suspension and river water. *J Appl Bacteriol* 1978; 45: 249–258.
34. Hirsh P., Mevs U., Kroppenstedt R.M., Schumann P., Stackebrandt E. Cryptoeolithophilic actinomycetes from antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Syst Appl Microbiol* 2004; 27: 166–174.
35. Hanka L.J., Schaadt R.D. Method for isolation of *Streptovorticillium* from soil. *J Antibiot* 1988; 44: 4: 576–578.
36. Gavrilish E., Bollmann A., Epstein S., Lewis K. A trap for *in situ* cultivation of filamentous actinobacteria. *J Microbiol Methods* 2008; 72: 3: 257–262.
37. Miquely E., Martin C., Manuel C.H., Manzanal B. Synchronous germination of *Streptomyces antibioticus* spores: Tool for analysis of hyphal growth in liquid cultures. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 109: 2–3: 123–130.
38. Terехova L. Isolation of actinomycetes with the use of microwaves and electric pulses. Selective isolation of rare actinomycetes. Ed. Ipek Kurtböke. Queensland. Australia. University of the Sunshine Coast. 2003; 82–101.
39. Галатенко О.А., Терехова Л.П., Ли Ю.В., Малкина Н.Д., Бойкова Ю.В., Зенкова В.А., Катруха Г.С. Образование эхиномицина культурой *Actinomadura* sp. ИНА 654. Антибиотики и химиотер 2006; 51: 3–7. / Galatenko O.A., Terехova L.P., Li Ju.V., Malkina N.D., Bojkova Ju.V., Zenkova V.A., Katruha G.S. Obrazovanie ehinomicina kul'turoj *Actinomadura* sp. INA 654. Antibiotiki i himioter 2006; 51: 3–7. [in Russian]
40. Зенова Г.М., Шульга-Михайлова Н.В., Лихачева А.А., Грядунова А.А. Селективные приёмы выделения из почвы актиномицетов олигоспоровой группы. Почвоведение. 2002; 4: 465–469. / Zenova G.M., Shul'ga-Mihajlova N.V., Lihacheva A.A., Grjadunova A.A. Selektivnye priemy vydelenija iz pochvy aktinomycetov oligosporovoj grupy. *Pochvovedenie*. 2002; 4: 465–469. [in Russian]
41. Suzuki S.I., Okuda T., Komatsubara S. Selective isolation and distribution of *Actinobispora* strains in soil. *Can J Microbiol* 2000; 46: 8: 708–715.

42. Suzuki S.I., Okuda T., Komatsubara S. Selective isolation and distribution of the genus *Planomonospora* in soil. *Can J Microbiol* 2001; 47: 3: 253—263.
43. Wang Y., Zhang Z.S., Ruan J.S., Wang Y.M., All S.M. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1999; 23: 178—187.
44. Hayakawa M., Otaguro M., Takeuchi T., Yamazaki T., Iimura Y. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. *Anton Leeuwenhoek Int J Gen M.* 2000; 78: 2: 171—185.
45. Qiu, D., Ruan, J. & Huang, Y. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 17: 5593—5597.
46. Kurtböke D.I., Chen C.F., Williams S.T. Use of polyvalent phage for reduction of streptomycetes on soil dilution plates. *J Appl Bacteriol* 1992; 72: 2: 103—111.
47. McKenna F., El-Tarabily K.A., Petrie S., Chen C., Dell B. Application of actinomycetes to soil to ameliorate water repellence. *Lett Appl Microbiol* 2002; 35: 5: 107—112.
48. Одум Ю. Экология. М.: Мир. 1986; 1—2: 326, 327. / Odum Ju. *Jekologija*. M.: Mir. 1986; 1—2: 326, 327. [in Russian]
49. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. М.: Книжный дом Университет. 2001; 256. / Zavarzin G.A., Kolotilova N.N. *Vvedenie v prirovedcheskuyu mikrobiologiju*. M.: Knizhnyj dom Universitet. 2001; 256. [in Russian]
50. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС. 2001; 256. / Zvjagincev D.G., Zenova G.M. *Jekologija aktinomicetov*. M.: GEOS. 2001; 256. [in Russian]
51. Зенова Г.М. Михайлова Н.В., Звягинцев Д.Г. Динамика популяций олигоспоровых актиномицетов в чернозёме. *Микробиология*. 2000; 69: 1: 127—131. / Zenova G.M. Mihajlova N.V., Zvjagincev D.G. *Dinamika populjacij oligosporovyh aktinomicetov v chernozeme*. *Mikrobiologija*. 2000; 69: 1: 127—131. [in Russian]
52. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Касаикина О.Т., Круговов Д.А., Гальченко В.Ф. Индукция роста и стабилизация популяционного состава *Saccharopolyspora erythraea* соединениями из группы катехоламинов. *Микробиология*. 2010; 79: 2: 213—218. / Filippova S.N., Surgucheva N.A., Kasaikina O.T., Krugovov D.A., Gal'chenko V.F. *Indukcija rosta i stabilizacija populjacionnogo sostava Saccharopolyspora erythraea soedinenijami iz grupy kateholaminov*. *Mikrobiologija*. 2010; 79: 2: 213—218. [in Russian]
53. Мачавариани Н.Г., Терехова Л.П. Новый метод выделения актиномицетов из почвы. Сборник научных докладов. Актуальные вопросы в современной науке. Варшава. 2013; 9—12. / Machavariani N.G., Terehova L.P. *Novyj metod vydelenija aktinomicetov iz pochvy*. *Sbornik nauchnyh dokladov. Aktual'nye voprosy v sovremennoj nauke*. Varshava. 2013; 9—12. [in Russian]
54. Синёва О.Н., Иванкова Т.А., Терехова Л.П. Использование сока алоэ для выделения актиномицетов. Материалы III Международной научно-практической конференции. Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития. Краснодар. 2013; 105—107. / Sinjova O.N., Ivankova T.A., Terehova L.P. *Ispol'zovanie soka aloje dlja vydelenija aktinomicetov*. *Materialy III Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii. Medicina: aktual'nye voprosy i tendencii razvitija*. Krasnodar. 2013; 105—107. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Синёва Ольга Николаевна - младший научный сотрудник, НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

Терехова Лариса Петровна - д.б.н., профессор, руководитель Отдела микробиологии, НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

Методология поиска новых антибиотиков: состояние и перспективы

А. С. ТРЕНИН

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

Methodology of Screening New Antibiotics: Present Status and Prospects

A. S. TRENIN

G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

В связи с широким распространением устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к существующим лекарственным препаратам, серьёзными проблемами в лечении микробных и вирусных инфекций, опухолевых заболеваний, потребность в новых антибиотиках чрезвычайно велика. В обзоре рассматриваются основные методологические подходы к созданию антибиотиков — возможностью их получения химическим синтезом или путём поиска биологически активных природных соединений, главным образом среди продуктов микробного вторичного метаболизма. Поиск природных соединений, отличающихся большим разнообразием, позволяет получать антибиотики разнообразной химической структуры и различного механизма действия, способен обеспечить создание новых эффективных лекарственных средств. Основное внимание в обзоре уделяется работе с микроорганизмами-продуцентами и образуемыми ими микробными метаболитами. Подробно рассматриваются методологические вопросы, связанные с выделением микроорганизмов из природных мест обитания, культивированием продуцентов, приводящим к накоплению ими биологически активных соединений, выделением и химической идентификацией микробных метаболитов, выявлением характера их биологического действия. Особое внимание уделяется вопросам микробного вторичного метаболизма и разработке новых моделей поиска биологически активных соединений. Рассматриваются достижения последних лет и наиболее перспективные направления дальнейших исследований. Основной методологический подход, связанный с выделением и культивированием продуцентов, сохраняет актуальность, однако нуждается в значительном усовершенствовании. Повышение эффективности поисковых работ может быть обеспечено ускорением химической идентификации антибиотиков, а также разработкой и применением новых моделей поиска, основанных на выявлении биологической активности.

Ключевые слова: поиск антибиотиков, антибактериальные, противогрибковые, противовирусные и противоопухолевые антибиотики, ингибиторы биосинтеза стеролов, мишени действия антибиотиков, новые антибиотики, микробные модели в поиске антибиотиков, микробные тест-системы, вторичный метаболизм, культивирование микробных продуцентов, миниатюризация, выделение и идентификация антибиотиков.

Due to extensive distribution of pathogen resistance to available pharmaceuticals and serious problems in the treatment of various infections and tumor diseases, the necessity of new antibiotics is urgent. The basic methodological approaches to chemical synthesis of antibiotics and screening of new antibiotics among natural products, mainly among microbial secondary metabolites, are considered in the review. Since the natural compounds are very much diverse, screening of such substances gives a good opportunity to discover antibiotics of various chemical structure and mechanism of action. Such an approach followed by chemical or biological transformation, is capable of providing the health care with new effective pharmaceuticals. The review is mainly concentrated on screening of natural products and methodological problems, such as: isolation of microbial producers from the habitats, cultivation of microorganisms producing appropriate substances, isolation and chemical characterization of microbial metabolites, identification of the biological activity of the metabolites. The main attention is paid to the problems of microbial secondary metabolism and design of new models for screening biologically active compounds. The last achievements in the field of antibiotics and most perspective approaches to future investigations are discussed. The main methodological approach to isolation and cultivation of the producers remains actual and needs constant improvement. The increase of the screening efficiency can be achieved by more rapid chemical identification of antibiotics and design of new screening models based on the biological activity detection.

Key words: antibiotic screening, antimicrobials, antifungals, antivirals, antitumors, sterol biosynthesis inhibitors, targets, new antibiotics, microbial models for antibiotic screening, microbial test-systems, secondary metabolism, producer cultivation, miniaturization, antibiotic recovery and identification.

Введение

Несмотря на грандиозные успехи, достигнутые в лечении инфекционных заболеваний благодаря использованию антибиотиков, потребность в создании новых антибиотических препаратов

чрезвычайно велика. Инфекционные заболевания по-прежнему остаются угрозой, являясь основной причиной смертности в развивающихся странах и серьёзной проблемой для передовых стран [1]. Ухудшение экологической обстановки, эпидемия ВИЧ, широкое использование трансплантационной и противораковой терапии, рост числа хирургических вмешательств, широкое и

© А. С. Тренин, 2015

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБНУ НИИНА

необоснованное использование антибиотиков приводит к появлению заболеваний, с трудом поддающихся лечению существующими лекарственными препаратами [2, 3]. Лекарственная устойчивость, в том числе множественная лекарственная устойчивость (MDR), т.е. одновременная резистентность возбудителей сразу к нескольким лекарственным препаратам, становится одной из основных проблем современной медицины [1, 4].

Наблюдается стремительный рост заболеваемости глубокими (инвазивными) микозами, протекающими крайне тяжело и характеризующимися высокой смертностью. Прогнозы развития грибковых заболеваний неутешительны. Противогрибковых препаратов относительно немного и они, как правило, высокотоксичны. Необходимы новые более совершенные противогрибковые антибиотики [5].

Одной из самых серьёзных проблем современной медицины по-прежнему остаются злокачественные новообразования, трудность лечения которых также усугубляется развитием резистентности опухолей к применяемым лекарственным препаратам. Несмотря на разработку довольно эффективных методов лечения и новых лекарственных средств, в том числе противоопухолевых антибиотиков, потребность в разработке новых противоопухолевых препаратов чрезвычайно велика [6–8].

Очевидна также необходимость создания противовирусных препаратов, особенно в свете развития эпидемии СПИДа. Как показывают результаты исследований, проведённых в последние годы, препараты, эффективные в отношении ВИЧ, могут быть разработаны на основе антибиотиков [9].

Актуальной и нерешённой до сих пор проблемой здравоохранения являются сердечно-сосудистые заболевания на почве атеросклероза. От осложнений, вызванных атеросклерозом, в ведущих странах мира в возрасте после 40 лет погибает каждый второй человек. Вопросы, связанные с возможностью медикаментозного лечения ишемической болезни сердца и профилактикой атеросклероза, весьма актуальны. Их решение в последнее время также связывают с созданием и применением новой группы антибиотических препаратов — статинами, являющимися ингибиторами биосинтеза стеролов [10].

Особую тревогу вызывает тот факт, что стремительное увеличение числа заболеваний, вызываемых устойчивыми формами микроорганизмов, происходит на фоне очевидных трудностей в создании новых лекарственных препаратов. Число новых антибиотиков, прошедших всесторонние испытания и рекомендованных к клиническому использованию, с каждым десятилетием неуклонно снижается [11–14]. Существующие

подходы к созданию новых антибиотиков трудоёмки и не позволяют обеспечить должной эффективности поисковых исследований [15]. Методология поисковых работ и создания новых антибиотиков нуждается в серьёзном усовершенствовании [16–18].

1. Пути создания новых антибиотиков

Как известно, антибиотики являются биологически активными соединениями, в основном природного происхождения, и образуются различными организмами, главным образом микроорганизмами [17, 19]. Основным способом получения антибиотиков является культивирование микробных продуцентов в условиях, способствующих наилучшему выходу целевого продукта, с последующим выделением и химической очисткой препаратов. Этот подход, нередко сопровождаемый химической или биологической трансформацией антибиотиков с целью улучшения их биологических свойств, как полагают, способен обеспечить создание новых эффективных лекарственных препаратов [6, 7, 11, 12, 16, 18, 20–23].

Знание полной структуры природных антибиотиков позволяет в ряде случаев осуществить синтез природного соединения химическим способом. Тем не менее основная масса антибиотиков производится микробиологическим путём и главным способом разработки новых антибиотических препаратов является поиск подобных соединений в природе [17, 18, 24–27].

Другим важным направлением в создании новых антибиотиков является получение и тестирование оригинальных синтетических препаратов. В этом случае наиболее пристального внимания заслуживают соединения, относящиеся к ранее не изученным классам химических веществ, а также производные, получаемые в ряду уже зарекомендовавших себя классов химических соединений [28]. Подобный путь создания новых лекарственных препаратов безусловно заслуживает внимания, однако следует признать, что в настоящее время результаты, полученные с его помощью, значительно уступают успехам, сопутствующим разработке антибиотиков, получаемых на основе природных метаболитов [11, 12, 23].

Микроорганизмы по-прежнему остаются важнейшим и практически неисчерпаемым источником лекарственных соединений [11, 12, 15, 29, 30]. В процессе поиска и выделения новых микробных вторичных метаболитов удается получать соединения, обладающие принципиально новой химической структурой и механизмом действия [11, 12, 15, 16, 23, 28, 31]. Большинство антибиотиков были получены путём выделения микроорганизмов из природных мест обитания, главным образом из почвы, и последующего

культивирования в лабораторных условиях с получением целевого продукта [6, 11, 12, 15, 17].

Эффективность и конечный результат поиска новых антибиотиков во многом зависят от применяемых методологических подходов. Современные концепции в области поиска преследуют цель существенно снизить затраты, связанные с повторным выделением и «переоткрытием» уже известных препаратов. Для идентификации подобных веществ на наиболее ранних этапах поиска разрабатываются компьютерные базы данных, широко используются современные методы анализа, позволяющие выявить принадлежность метаболитов к конкретным классам химических соединений [7, 11, 12, 20, 24].

Очевидно, что в силу непомерно большого объёма исследований практически невозможно осуществлять тотальную проверку всех выделяемых в процессе поисковых работ микробных метаболитов. Для выявления среди них веществ, обладающих биологическим действием, позволяющим рассматривать их в качестве потенциальных лекарственных средств, необходим целенаправленный отбор, в основе которого должно быть ясное представление о конечной цели — создании препарата с определённой биологической активностью. Вот почему основной упор делается на разработку новых модельных систем, позволяющих выявлять препараты по их биологической активности и соответственно находить образующие их штаммы-продуценты [18, 22].

Методология поиска стремится учесть такие факторы, как механизм действия препарата, его принадлежность к определённому классу химических соединений, химическую структуру, особенности биосинтеза, потенциальную биологическую роль в физиологии микроорганизма-продуцента и целый ряд других немаловажных факторов, способных кардинальным образом влиять на эффективность и конечный результат поисковой работы [20, 29].

Поскольку подобные разнообразные факторы, заложенные в методологию поиска, весьма неравноценны и обладают разной значимостью на различных этапах исследования, вся система поиска биологически активных веществ требует выработки соответствующей системы приоритетов [32, 33].

Поиск и ранняя идентификация природных соединений, ориентированные на химические характеристики препаратов, их принадлежность к определённому, заранее намеченному классам химических соединений, т.е. проведение так называемого. «химического» скрининга [34], существенно повышают эффективность поисковых работ, однако в наибольшей степени проявляют себя в поиске аналогов уже известных препаратов [35].

Для эффективного обнаружения принципиально новых биологически активных соединений, необходим подход, направленный в первую оче-

редь на выявление их биологической активности. Поиск новых антибиотиков, ориентированный на механизм действия отбираемых соединений, широко используется в мировой практике, приносит успех, позволяет создавать лекарственные препараты, становящиеся родоначальниками новых классов биологически активных соединений (противоопухолевые антибиотики, антибиотик-иммуномодуляторы, гиполипидемические препараты и др.) [13, 22].

Эффективный поиск, направленный на выявление биологической активности соединений, возможен лишь при наличии в практике лаборатории соответствующих биологических и биохимических моделей поиска. От их чувствительности, надёжности, пригодности к использованию для анализа биологически активных метаболитов, прошедших лишь начальные этапы химической очистки на ранних этапах поисковых работ, зависит конечный результат исследований — выявление новых биологически активных соединений [36, 37].

Поскольку практически невозможно создание единого универсального теста, отвечающего одновременно всем критериям, модели разрабатываются для каждой конкретной, отличной от других по механизму действия, группы антибиотиков. Как правило, требуется создание комплекса тестов, обладающих разной эффективностью на разных этапах поиска, и разработка наиболее эффективной схемы их применения.

В поисковой работе используются методологические подходы, позволяющие наиболее полно раскрыть потенциальные возможности микробных продуцентов. Проводимый при этом комплекс работ включает:

- выделение микроорганизмов из природных мест обитания,
- культивирование продуцентов, приводящее к накоплению ими биологически активных соединений,
- выделение и химическую идентификацию микробных метаболитов,
- выявление характера их биологического действия (типирование).

Таким образом, все многочисленные манипуляции, используемые при проведении поисковых исследований, можно отнести к двум основным категориям — работе с микроорганизмами-продуцентами и к работе с образуемыми ими микробными метаболитами.

2. Новые методологические подходы в работе с микроорганизмами-продуцентами: выделение и культивирование продуцентов, изучение вторичного метаболизма

2.1. Выделение продуцентов

Микроорганизмы — ценный источник получения разнообразных биологически активных соединений. Их выделению из природных источников уделяется в настоящее время большое внимание [7, 34, 38].

Постоянно совершенствуются методы поиска, изоляции и идентификации микроорганизмов [24]. Особое внимание уделяется редким видам микроорганизмов, как потенциальному источнику новых, ранее неизвестных, антибиотиков [23, 32, 38, 39].

Не все микроорганизмы удастся изолировать, не все они поддаются успешному культивированию [40, 41]. Имея в виду химическое разнообразие препаратов, выделенных из культивируемых микроорганизмов, можно ожидать, что многие продукты жизнедеятельности почвенных микроорганизмов по-прежнему остаются неоткрытыми [11, 12, 15, 32, 39]. Существует настоятельная необходимость в создании новых более эффективных методов выделения и культивирования микроорганизмов-продуцентов. Кроме того, необходима разработка подходов, позволяющих использовать некультивируемые микроорганизмы [12, 17, 32].

В настоящее время имеются перспективы изучения биохимии почвенных микроорганизмов, а также доступ к их метаболитам без использования традиционных методов культивирования. Основанные на применении геномных манипуляций, такие подходы подразумевают выделение из почвы не самих микроорганизмов-продуцентов, а их генома. Предполагается, что путём прямого клонирования выделенной из почвы ДНК в виде искусственных бактериальных хромосомных векторов и создания общих геномов («метагеномов») с геномами *E.coli* или других организмов-реципиентов откроется доступ к новым метаболитам, в том числе новым антибиотикам [32, 42].

Проводимые в настоящее время исследования свидетельствуют о том, что подобный подход технически возможен и способен принести определённый успех. Например, таким способом, благодаря созданию и использованию метагеномных библиотек, состоящих из клонов ДНК *E.coli*, содержащих фрагменты ДНК почвенных микроорганизмов, удастся получать новые биологические соединения, в том числе новые антибиотики, в частности турбомицин, террагины, а также обладающие широким спектром антибактериального действия виолацеин и дезоксивиолацеин [42, 43].

Тем не менее приходится констатировать, что в силу чрезвычайно высокой трудоёмкости использование метагеномного подхода для разработки новых антибиотиков остается весьма проблематичным, а новые препараты по-прежнему получают менее трудоёмким традиционным способом, с помощью изолированных из

природных источников микроорганизмов продуцентов [16, 18, 25, 44].

2.2. Изучение вторичного метаболизма

Способность микроорганизмов к образованию веществ, обладающих антибиотическими свойствами, является результатом существования и успешного функционирования в микробных клетках особых биохимических процессов, объединяемых понятием вторичного метаболизма. Как известно, реакции вторичного метаболизма не связаны непосредственно с процессами получения энергии или строительством компонентов клетки [17]. Сами антибиотики — типичные вторичные метаболиты — справедливо рассматриваются в качестве одного из наиболее важных продуктов микробного метаболизма этого типа [11, 19].

Изучение вторичного метаболизма помогает выявить способность микроорганизмов-продуцентов к конкретным биохимическим процессам и соответственно повысить вероятность обнаружения образуемых ими вторичных метаболитов [13].

Этому может способствовать также изучение процессов, общих для первичного и вторичного метаболизма, в частности изучение влияния А-фактора и подобных ему соединений стрептомицетов, выполняющих функцию авторегуляторов, являющимся, по-видимому, важной составной частью бактериальной системы кворум-сенсинга [45]. Образование подобных веществ и их накопление культурой-продуцентом обычно предшествует началу активного синтеза антибиотика [46]. Дерепрессируя определённые участки ДНК *Streptomyces griseus*, *S.coelicolor*, некоторых других актиномицетов, А-фактор и сходные с ним другие сигнальные молекулы бутиролактонов осуществляют запуск разнообразных процессов, необходимых в конечном счёте как для морфогенеза, так и для вторичного метаболизма продуцентов [17, 45].

Важными регуляторными функциями, необходимыми для поддержания нормальной жизнедеятельности образующих их микроорганизмов, обладают, по-видимому, некоторые антибиотики, например монензин, стауроспорин и его аналоги, являющиеся сильными ингибиторами некоторых протеинкиназ, а также полимиксины В и Е, разнообразные микроцины [45, 47, 48]. Применение подобных регуляторных факторов в исследовательской работе способно влиять на биосинтез антибиотиков и соответственно может повысить вероятность обнаружения новых антибиотиков в поисковой работе.

Образование вторичных метаболитов в значительной степени зависит от состояния и функционирования систем первичного метаболизма, поскольку последний, определяя основные биохимические процессы, способствует накоплению необходимого строительного материала. Ан-

тибиотики синтезируются из продуктов первичного метаболизма, таких как органические кислоты, аминокислоты, сахара. Повышенное внимание к отдельным аспектам первичного метаболизма штаммов-продуцентов, в частности к метаболизму у них аминокислот, может способствовать лучшему выявлению потенциальных возможностей штаммов-продуцентов. Например, при выделении из почвы микроорганизмов, обладающих изменённой регуляцией биосинтеза аминокислот, удастся резко повысить вероятность обнаружения продуцентов новых антибиотиков [46, 49, 50].

2.3. Культивирование продуцентов

Вторичные метаболиты не являются незаменимыми веществами, для их биосинтеза ещё недостаточно присутствия в клетках определённой обуславливающей их синтез генетической информации [51]. Для активной экспрессии генов вторичного метаболизма необходимо создание особых условий [24]. Хорошо известно влияние на биосинтез антибиотиков состава питательной среды, уровня аэрации и прочих факторов, изменение которых влечёт за собой многочисленные вариации в продукции вторичных метаболитов [34, 51—53]. Внесение в среду культивирования различных элементов и биохимических метаболитов способно существенно повлиять на образование культурой-продуцентом антибиотиков, резко изменить состав образуемого ею антибиотического комплекса [53]. Таким образом, для выявления потенциальных способностей микроорганизмов к образованию антибиотиков целесообразно проводить выращивание свежесекретированных из почвы новых продуцентов в необычных условиях, в том числе, используя новые способы культивирования, связанные с применением необычной микробиологической посуды, в частности стерильных пластиковых планшетов [23, 51, 54, 55]. Методы, направленные на миниатюризацию и механизацию микробиологических исследований, способствуют эффективному подбору условий культивирования штаммов-продуцентов и увеличению пропускной способности скрининга. Культивирование в пластиковых планшетах позволяет активизировать работу со штаммами-продуцентами при изучении их культуральных и физиолого-биохимических свойств, ростовых потребностей и способности к продукции биологически активных соединений и, в целом, позволяет значительно снизить трудоёмкость изучения штаммов-продуцентов [37].

Методы миниатюризации чрезвычайно полезны также в работе с микробными тест-культурами. На основе использования микрометодов и культивирования микроорганизмов в пластиковых планшетах удастся разработать эффективные микрометоды определения антимикробной ак-

тивности [56, 57], а также новые микробные тест-системы, необходимые для поиска новых антибиотиков, в частности ингибиторов биосинтеза стеролов, требующие выполнения большого количества манипуляций, постановки значительного числа повторов в опыте, необходимых для проведения статистической обработки получаемых результатов [37, 58—60].

2.4. Биохимические и генетические аспекты биосинтеза антибиотиков

Хорошо известна способность многих штаммов-продуцентов, особенно в группе актиномицетов, к образованию одновременно нескольких различных антибиотиков. Секвенирование геномов продуцентов показало существование в каждом из них разнообразных генных кластеров, ответственных за образование антибиотиков различных групп [49], и явилось подтверждением концепции антибиотикообразования, основная идея которой выражается формулой «один штамм — много соединений». Это подразумевает необходимость тщательного изучения каждого конкретного штамма-продуцента [61].

Значительные успехи в последние годы достигнуты в изучении путей биосинтеза вторичных метаболитов, что стало возможным благодаря тесной кооперации специалистов различного профиля, широкому внедрению генетических методов исследования. Особый прогресс наблюдается в изучении вторичных метаболитов, синтезируемых по поликетидному пути, имеющему немало общих черт с системой синтеза жирных кислот, при которой непосредственно вслед за конденсацией очередной малонатной единицы происходит восстановление карбонильных групп, в результате чего образующаяся углеродная цепь обладает линейной структурой и насыщенными углеродными связями [62, 63]. Поскольку при биосинтезе вторичных метаболитов подобного восстановления либо не происходит, либо оно осуществляется частично, образующиеся углеродные структуры имеют характер ароматических или макролидных колец. По этой схеме синтезируются тетрациклины, антрациклины, анзамицины, макролиды и ряд других известных антибиотиков [62]. Досконально изучена схема биосинтеза указанных антибиотиков с выявлением работающих на её отдельных этапах ферментов, ответственных за синтез, циклизацию и восстановление образуемых поликетидных структур.

Гены, кодирующие соответствующие ферменты, картированы [11, 49, 62, 64, 65], участки ДНК, ответственные за биосинтез многих антибиотиков, локализованы [15, 66], геном ряда продуцентов полностью расшифрован [67]. Клонированы гены поликетидсинтаз — больших многофункциональных ферментов, занятых в образовании многих антибиотиков, таких как тет-

рациклин, турбомицин, полиеновые антибиотики и многие другие [49, 62, 63, 68].

Знание точной локализации генов позволяет посредством применения генно-инженерных методов создавать штаммы продуценты, обладающие разным набором генов биосинтеза, открывает новые перспективы для получения подобными гибридными организмами «гибридных» молекул антибиотиков [16, 62, 63, 68].

Комбинирование генов поликетидного синтеза было проведено у различных стрептомицетов — продуцентов актинородина, авермектина, эритромицина [62]. Выявлен «минимальный» набор генов, контролирующих образование молекул антибиотиков, в т.ч. длину цепи, степень её восстановления, циклизацию [28]. Изучены разновидности подобных генов у различных стрептомицетов, выявлены их филогенетические связи. Полученные результаты демонстрируют, что описываемый подход, основанный на комбинировании генов, позволяет эффективно влиять на структуру новых «гибридных» молекул [62, 69].

Вместе с тем гены, участвующие в биосинтезе антибиотиков, весьма многочисленны, локализованы в различных частях хромосомы продуцента, могут иметь плазмидную локализацию [15], что в совокупности сильно затрудняет их выделение и последующую слаженную организацию работы в новом генно-инженерном продуценте [70]. К тому же для эффективной работы такого гибридного продуцента необходимо учитывать степень его устойчивости к образуемому им антибиотику [71]. В связи с этим параллельно с выделением и клонированием генов биосинтеза проводится выделение и клонирование имеющихся у продуцентов генов устойчивости. Клонированы гены, обуславливающие резистентность *S. antibioticus* к олеандомицину [72], *Amycolatopsis mediterranei* к гликопептидному антибиотику балхимицину [73], другим антибиотикам [49, 74].

Яркой иллюстрацией возможности создания «гибридных» препаратов, являются работы в области генно-инженерных антибиотиков полиенов [69]. Например, антибиотик S44HP, полученный генно-инженерной модификацией продуцента нистатина *Streptomyces noursei*, обладает гидрофильным участком лактонового кольца, аналогичным исходному препарату нистатину, а по своей гидрофобной части оказывается полным аналогом другого антибиотика — амфотерицина В. Генетически модифицированные антибиотики полиены могут быть с успехом использованы в качестве основы для создания новых химически модифицированных производных [75].

Важно отметить, что, несмотря на очевидные достижения в этой области, работа по созданию генно-инженерных продуцентов путём выделения и клонирования всех генов, ответственных за

успешный биосинтез антибиотика, оказывается чрезвычайно трудоёмкой и не гарантирует положительного результата [3, 16]. Вот почему в создании ценных с практической точки зрения продуцентов по-прежнему не утратил значения метод слияния протопластов [76]. Проводя манипуляции не с отдельными генами, а с целыми геномами или блоками генов у недостаточно изученных с генетической точки зрения штаммов, исследователи добиваются существенного и нередко полезного изменения их свойств [77]. Использование на ранних этапах поиска процедуры протопластирования клеток продуцентов, в том числе в сочетании с УФ-облучением, оказывает воздействие на продуктивность микроорганизмов и в конечном итоге на обнаружение образуемых им биологически активных метаболитов [78].

Таким образом, в настоящее время подходы к изучению микробных продуцентов на начальном этапе поисковых исследований, связанные с разработкой новых способов изоляции микробных продуцентов из природных мест обитания и использованием новых необычных условий культивирования, удается существенно развить и дополнить. Благодаря успехам в изучении биохимических основ вторичного метаболизма, выявлению генетической природы образования многих антибиотиков, стало возможным проведение целенаправленных перестроек генома продуцентов, приводящих к существенному изменению биосинтеза ими вторичных метаболитов, увеличению активности продуцентов и созданию новых «гибридных» антибиотиков.

3. Новые методологические подходы к работе с микробными метаболитами, их выделение и идентификация, выявление характера биологического действия

3.1. Выделение и идентификация микробных метаболитов

Развитие и широкое использование компьютерных баз данных, применение высокоэффективной жидкостной хроматографии, УФ- и ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, других методов позволяет существенно увеличить вероятность обнаружения метаболитов, принадлежащих к определённым заранее намеченным классам соединений и тем самым резко повысить скорость и эффективность химической идентификации антибиотиков [7, 20, 79]. По-видимому, дальнейшее совершенствование физико-химических методов быстрой идентификации антибиотиков является одним из наиболее важных и перспективных направлений, способствующих ускорению и интенсификации поисковых исследова-

дований. Тем не менее использование этих методов требует проведения ряда подготовительных операций, подразумевающих обработку культуральной жидкости и мицелия продуцентов, обычно включающую в себя экстракцию микробных метаболитов химическими растворителями, упаривание, хроматографию, другие химические методы очистки препаратов. Химические методы выделения и очистки, основанные, как правило, на знании свойств выделяемых вторичных метаболитов, главным образом растворимости в воде или различных органических растворителях, нередко оказываются весьма трудоёмкими и далеко не всегда позволяют в активном виде выделить изучаемые вещества [20].

Следует отметить, что, помимо своей трудоёмкости, подобные методы не могут гарантировать извлечения всех перспективных метаболитов, имеющих в культуральной жидкости и мицелии конкретного штамма-продуцента, и соответственно не обеспечивают полного выявления указанных метаболитов в ходе поисковых работ. Кроме того, содержание биологически активных соединений в культуральной жидкости может оказаться низким и, при использовании малочувствительных тестов, недостаточным для выявления биологически активных соединений. Тогда, наряду с извлечением изучаемых веществ и их очисткой от нежелательных компонентов питательной среды и других примесей, может потребоваться некоторое, иногда существенное, концентрирование исследуемых метаболитов.

В настоящее время разрабатываются новые подходы к выделению вторичных метаболитов, позволяющие применять более универсальные и менее трудоёмкие методы, включая скоростное центрифугирование, микро- и ультрафильтрационную очистку культуральной жидкости [37]. Сочетание таких приёмов с классическими методами очистки даёт существенный выигрыш в работе, особенно на начальном этапе поиска, позволяет эффективнее проводить выделение вторичных метаболитов, необходимое для их испытания в последующих специальных тестах [24]. Концентрирование микробных метаболитов в образцах культуральной жидкости, необходимое для их обнаружения в специальных тестах, при этом может быть достигнуто с помощью лиофилизации [9].

Применение операций, способствующих лучшему выделению биологически активных соединений несомненно вносят существенный вклад в успех поисковых работ. Однако наиболее значимую роль в поиске играют методы, позволяющие получить представление о характере биологичес-

кой активности выделяемых соединений, их возможном механизме действия [18, 36, 41, 58, 59, 80].

3.2. Выявление характера биологического действия (типирование) вторичных метаболитов

Методы типирования биологической активности позволяют получить представление о возможном механизме действия микробных метаболитов и сделать вывод о целесообразности дальнейшего изучения обнаруженных соединений, а также образующих их микробных штаммов. Совершенствованию методов выявления биологической активности, разработке новых более рациональных схем их применения уделяется в настоящее время самое пристальное внимание. От них в первую очередь зависит конечный результат и эффективность всех поисковых работ.

В отличие от достаточно универсальных микробиологических и химических методов, используемых при культивировании штаммов-продуцентов и очистке образуемых ими микробных продуктов, специальные методы поиска, основанные на выявлении биологического действия препаратов, имеют значительно более узкую направленность. Как правило, они предназначены для выявления микробных метаболитов, принадлежащих к отдельным конкретным группам биологически активных соединений [28, 29], например, специально разрабатываются для поиска антибиотиков-иммунодепрессантов [81], противоопухолевых антибиотиков [82], или препаратов, специфические особенности механизма действия которых позволяют преодолевать лекарственную устойчивость [41, 83].

Для поисковых исследований необходима разработка специальных тестов, пригодных для использования на самых ранних этапах поиска, например, в отборе биологически активных метаболитов, прошедших лишь начальные этапы химической очистки. Такие тесты должны отвечать целому ряду требований:

- позволять делать корректные выводы о характере биологической активности тестируемых метаболитов;
- обладать достаточно высокой чувствительностью;
- не давать ложноотрицательных результатов¹;
- не давать большого числа ложноположительных результатов²;
- применяться на разных этапах скрининга, в т.ч. на начальных этапах работы с продуцентами (желательно на уровне тестирования культуральной жидкости и грубоочищенных препаратов);
- быть относительно недорогими и простыми в использовании;

¹ В противном случае при проведении отбора будут в большом количестве отсеиваться ценные метаболиты.

² В противном случае отбор теряет свою эффективность, поскольку осуществляется слишком малый отсев ненужных веществ.

- обладать высокой пропускной способностью;
- быть перспективными для дальнейшей механизации и автоматизации.

Очевидно, что практически невозможно создание универсального теста, в равной степени отвечающего всем перечисленным выше критериям.

Для отбора микробных метаболитов, обладающих специфическим механизмом действия, необходима разработка и использование целого комплекса тестов, обладающих различной эффективностью на разных этапах поисковой работы. Тесты, способные давать лишь приблизительное представление о механизме действия отбираемых препаратов, вполне приемлемы и могут в силу своей простоты и дешевизны применяться на ранних этапах поиска. Важно, чтобы они не давали ложноотрицательных результатов, но при этом эффективно способствовали значительному сужению круга поиска. На более поздних этапах целесообразно применение более информативных, но нередко и более трудоёмких тестов. Таким образом, в поиске биологически активных веществ микробного происхождения необходимо использование комплексного подхода, подразумевающего умелое сочетание различных методов типирования биологической активности.

Разработка моделей поиска, направленных на выявление биологической активности микробных метаболитов, требует серьёзного анализа разнообразных сведений, касающихся механизма действия препаратов, структуры и функционирования чувствительных к этим препаратам мишеней. Эффективные модели поиска должны содержать в себе подобные мишени [18, 22, 29, 36, 41, 64, 84].

В качестве модели для поиска ингибиторов биохимических процессов нередко используются конкретные биохимические реакции [9, 26, 82, 84]. К сожалению, их использование не гарантирует того, что отобранные с их помощью соединения, эффективно подавлявшие соответствующую реакцию *in vitro*, смогут достигать природную мишень и соответственно проявить свои потенциальные способности в реальных условиях [16, 18, 33]. Кроме того, отбор, основанный на использовании биохимических реакций, как правило, требует анализа хорошо очищенных соединений. Он плохо применим на ранних этапах поиска природных метаболитов, содержащих, как известно, большое количество примесей [20, 29, 35].

Вот почему более целесообразным нередко оказывается разработка и применение в поисковых исследованиях моделей, основанных на использовании целых клеток. Это могут быть разнообразные микроорганизмы [24, 41, 80, 82, 85], или культуры клеток млекопитающих [31, 82, 86,

87]. Разрабатываются модели с использованием инфицированных многоклеточных организмов, среди которых могут быть как традиционные объекты (мыши), так и беспозвоночные животные — фруктовая мушка *Drosophila melanogaster* или круглые черви — нематоды *Caenorhabditis elegans* [33, 88, 89].

Большой интерес представляет также обращение к необычным группам бактерий, таких как археобактерии, многие свойства которых роднят их с клетками млекопитающих. Несколько видов галофильных археобактерий являются отличными модельными организмами, используемыми для исследования различных аспектов биохимии и молекулярной биологии, в частности, для изучения экспорта и деградации белков, регуляции транскрипции, поддержания структуры и репликации хромосом [90]. На их основе возможна разработка моделей поиска новых антибиотиков, в частности, ингибиторов биосинтеза стеролов и противоопухолевых антибиотиков [59, 60]. С помощью бактериальной модели *Halobacterium salinarum*, разработанной в виде микрометода и используемой на начальных этапах скрининга антибиотиков были отобраны природные антибиотики — ингибиторы ранних и поздних этапов биосинтеза стеролов, перспективные для разработки средств лечения атеросклероза и грибковых инфекций [37, 91—93], а также производные трисиндолилметанов — аналогов антибиотика турбомицина А, полученных в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе путём полного химического синтеза [60, 94].

4. Достижения и перспективные дальнейших скрининговых исследований

В настоящее время активно разрабатываются подходы к поиску антибиотиков, действие которых направлено на мишени, ранее широко не использовавшиеся в скрининговых исследованиях. Предложена новая модель поиска ингибиторов γ -глутамил спермин синтетазы PAUA2 — одной из шести γ -глутамил полиамин синтетаз, имеющих у *Pseudomonas aeruginosa*, ответственных за катаболизм полиаминов, жизненно необходимых для роста возбудителя [95]. Поиск биологически активных соединений — ингибиторов бактериальной ДНК гиразы/топоизомеразы, позволил получить новый антибиотик широкого спектра действия — AZD0914 [96]. Скрининг ингибиторов цистеиновой протеазы фальципаин-2 — одного из факторов вирулентности малярийного плазмодия, способствующего разрушению гемоглобина, позволил выделить новый антибиотик с антималярийным действием фальцитидин, образуемый почвенной миксобактерией *Chitinophaga* sp. [26]. При поиске ан-

антибиотиков, способствующих восстановлению активности бета-лактамов в отношении метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), обнаружены два новых природных антибиотика — циклический депсипептидный антибиотик кризиномицин и липогликопептидный антибиотик актинокарбазин, являющиеся ингибиторами сигнальной пептидазы I типа SpsB, предоставляющей сериновую протеазу, необходимую для секреции белков. Синтетическое производное актинокарбазина M131 обладало способностью восстанавливать и усиливать действие бета-лактамового антибиотика имипенема в отношении штаммов MRSA [97]. Наконец, проведение активного поиска в группе ингибиторов биосинтеза стеролов позволило обнаружить антибиотики, обладающие не только гипополипидемическим или антифунгальным, но также противовирусным и противоопухолевым действием [10].

Весьма перспективным направлением является поиск так называемых адьювантных соединений, способных усиливать подавляющее действие других антибиотиков. В ходе проведения такого поиска удалось обнаружить новые низкомолекулярные соединения, резко усиливающие активность существующих антибактериальных препаратов, в частности, был выявлен новый класс антрациклиновых антибиотиков, способных повысить чувствительность грамотрицательных бактерий к препаратам, исходно активным лишь в отношении грамположительных бактерий. Наблюдаемое повышение активности происходило, по-видимому, за счёт подавления адьювантами процессов активного выброса антибиотиков из клеток [98].

Способность к усилению действия антибиотиков, главным образом, за счёт подавления помпового выброса, выявлена также у алкалоидов, представляющих собой большую структурно разнообразную группу соединений, используемых для получения таких важных антибактериальных препаратов, как метронидазол и хинолоны. Обнаружено, что новый хинолоновый алкалоид актиномицетного происхождения CJ-13136 и скваламин-полиаминный алкалоид, выделенный из катрановой акулы, способны усилить чувствительность грамотрицательных бактерий к ципрофлоксацину [99].

Особого внимания заслуживает поиск биологически активных соединений, подавляющих экспрессию у возбудителей факторов вирулентности. К такому подавлению способны некоторые антибиотики, применяемые в субингибиторных концентрациях [100, 101]. Недавно с помощью компьютерного поиска удалось обнаружить новые низкомолекулярные соединения, обладающие антивирулентной активностью в от-

ношении метициллинрезистентных штаммов *S. aureus*. Выявленные соединения действовали на регулятор ArgA, выполняющий у этого возбудителя функцию транскрипционного фактора, необходимого для экспрессии генов токсинообразования. Не влияя на рост возбудителя, указанные низкомолекулярные соединения активно подавляли образование α -гемолизина и фенолорастворимого модулина — токсинов, участвующих в патогенезе заболеваний, вызываемых золотистым стафилококком [102].

При проведении скрининга антибиотиков, подавляющих связывание бактериального липополисахарида — компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий, известного как бактериальный эндотоксин, с рецептором CD14 лейкоцитов человека, удалось выявить активно блокирующие подобное связывание антибиотики педопептины A, B и C, образуемые грамотрицательной бактерией *Pedobacter* sp. SANK 72003, перспективные для лечения сепсиса и септического шока [44].

Поиск ингибиторов миграции опухолевых клеток позволил выделить из культуральной жидкости *Streptomyces* sp. MI264-NF2 новые вторичные метаболиты — миграцины A и B, подавляющие миграцию клеток лёгочной аденокарциномы A549 и фибросаркомы HT-1080, перспективные для дальнейшей разработки препаратов, подавляющих метастазирование опухолей в организме человека [87].

Перспективным направлением является поиск антибиотиков, подавляющих формирование возбудителями биоплёнок, защищающих их от воздействия антибиотиков и других биологически активных соединений. Биоплёнки представляют собой сложное сообщество микроорганизмов, прикреплённых к поверхности и погружённых в продуцируемую ими же внеклеточную матрицу. Изучению биоплёнок и действию на них различных соединений уделяется в настоящее время большое внимание [103].

Поскольку клетки биоплёнки приобретают повышенную толерантность к антимикробным соединениям и иммунной системе хозяина, инфекционные заболевания, сопровождающиеся образованием биоплёнок, имеют тенденцию переходить в хроническую форму. Активно проводится разработка средств, подавляющих образование биоплёнок [104].

Тот факт, что у бактерий рода *Salmonella* инактивация любой из систем активного мультилекарственного выброса приводит к подавлению транскрипции компонентов матрицы биоплёнки и соответственно к подавлению формирования биоплёнки [105], свидетельствует о тесной взаимосвязи указанных процессов и открывает новые перспективы решения столь важной проблемы.

За последние два — три года удалось выделить целый ряд новых оригинальных соединений. Среди вторичных метаболитов глубоководной культуры *Nocardioopsis alba* обнаружено семейство новых дикетопиперазиновых антибиотиков, обладающих выраженным противоопухолевым действием [7]. Выделены новые антибиотики андропростамина А и В, образуемые *Streptomyces* sp. МК 932-CF8, обладающие низкой токсичностью, подавляющие андрогенный рецептор, являющийся характерной мишенью рака простаты [31]. Выделен новый аминотетрациклиновый антибиотик омадацилин, разработанный для внутривенного и перорального введения, предназначенный для лечения многих инфекционных заболеваний, включая острые бактериальные инфекции кожи и мягких тканей, пневмонию и инфекции мочевыводящих путей, вызываемые резистентными к метициллину штаммами *S.aureus*, резистентными к ванкомицину штаммами *Enterococcus*, гемолитическими стрептококками и устойчивыми к пенициллину штаммами *Streptococcus pneumoniae* [106].

Выделены аминогликозидный антибиотик нового поколения плазомицин, активный в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и устойчивый к действию наиболее клинически значимых аминогликозид-модифицирующих ферментов [107], новый липопептидный антибиотик широкого спектра действия пенибактерин [108], новый циклический липопептидный антибиотик баттацин, обладающий выраженным бактерицидным действием в отношении грамотрицательных бактерий, способный к активному разрушению мембран этих микроорганизмов [109], а также антибиотики мангромамины А и В, обладающие значительной антигрибковой активностью [79]. Открыт новый класс борсодержащих антибактериальных препаратов [110] и перестроен «старый» антибиотик нибомидин, но уже с новыми свойствами — действием на хинолоноустойчивые штаммы *S.aureus* [83].

Проведённые исследования свидетельствуют о том, что благодаря разработке и внедрению в поисковую практику эффективной модели, основанной, главным образом, на типировании биологической активности, как правило, достигается положительный конечный результат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shallcross L.J., Davies S.C. The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2014; 69: 11: 2883—2885.
2. Monnet D.L. Raising awareness about prudent use of antibiotics: a necessity for the European Union. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28: Suppl: 4: 1—3.
3. Livermore D.M. Fourteen years in resistance. Int J Antimicrob Agents 2012; 39: 4: 283—294.
4. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 3: 268—281.

Заключение

Подводя итог, следует признать, что микроорганизмы остаются важнейшим источником лекарственных препаратов, важным и эффективным способом получения антибиотиков по-прежнему остается выделение и культивирование продуцентов в лабораторных условиях. В процессе поиска и выделения новых микробных вторичных метаболитов удается получать соединения, обладающие принципиально новой химической структурой и механизмом действия. Очевидно, что подход, связанный с созданием новых антибиотиков на основе проведения поиска среди продуктов микробного метаболизма, себя не исчерпал и требует дальнейшего развития.

Работы с микроорганизмами, а также продуктами их жизнедеятельности по-прежнему остаются в центре внимания исследователей, а разработка новых методов поиска антибиотиков среди продуктов микробного метаболизма приобретает ещё большую актуальность. Несмотря на появление многообещающего направления в поисковых исследованиях, связанного с применением «метагеномного» подхода, получение антибиотиков традиционным путём при культивировании продуцентов не утратило своей актуальности. Основные усилия в поиске направлены, главным образом, на разработку новых необычных способов культивирования микробных продуцентов, способов очистки образуемых ими вторичных метаболитов, а также ускоренную химическую идентификацию антибиотиков. Однако одним из наиболее радикальных способов повышения эффективности поисковых работ, по-видимому, является создание новых оригинальных методов типирования биологической активности выделяемых соединений.

Таким образом, основной методологический подход к созданию новых антибиотиков, связанный с выделением из природных источников и культивированием новых продуцентов, выделением и идентификацией образуемых ими биологически активных соединений, нуждается в дальнейшем развитии и совершенствовании.

5. Ruiz-Camps I., Cuenca-Estrella M. Antifungals for systemic use. Enferm Infecc Microbiol Clin 2009; 27: 6: 353—362.
6. Awakawa T. The International Conference of Natural Product Biosynthesis (ICNPB, 8th US-Japan seminar on the Biosynthesis of Natural Products). J Antibiot (Tokyo) 2012; 65: 11: 587—590.
7. Zhang Q., Li S., Chen Y. et al. New diketopiperazine derivatives from a deep-sea-derived *Nocardioopsis alba* SCSIO 03039. J Antibiot (Tokyo) 2013; 66: 1: 31—36.
8. Орлова Т.И., Булгакова В.Г., Полин А.Н. Вторичные метаболиты микроорганизмов — потенциальный резерв фармацевтических препаратов. Антибиотики и химиотерапия 2014; 3—4: 38—44. / Orlova T.I., Bulgakova V.G., Polin A.N. Vtorichnye metabolity mikroorganizmov — potencial'nyj rezerv farmacevticheskikh preparatov. Antibiotiki i himioter 2014; 3—4: 38—44. [in Russian]

9. Тренин А.С., Дудник Ю.В. Твердофазная система РНК-зависимой ДНК-полимеразы в поиске антибиотиков — потенциальных ингибиторов ВИЧ. *Антибиотики и химиотер* 2005; 50: 10—11: 4—12. / Trenin A.S., Dudnik Ju.V. Tverdofaznaja sistema RNK-zavisimoj DNK-polimerazy v poiske antibiotikov — potencial'nyh ingibitorov VICH. *Antibiotiki i himioter* 2005; 50: 10—11: 4—12. [in Russian]
10. Тренин А.С. Микробные метаболиты — ингибиторы биосинтеза стеролов, их химическое разнообразие и особенности механизма действия. *Биоорган хим* 2013; 39: 6: 633—657. / Trenin A.S. Mikrobnye metabolity — inhibitory biosinteza sterolov, ih himicheskoe raznoobrazie i osobennosti mehanizma dejstvija. *Bioorgan him* 2013; 39: 6: 633—657. [in Russian]
11. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 2005; 58: 1: 1—26.
12. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)* 2012; 65: 8: 385—395.
13. Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot (Tokyo)* 2009; 62: 1: 5—16.
14. Freire-Moran L., Aronsson B., Manz C. et al. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria. Time to react is now. *Drug Resist. Updat* 2011; 14: 2: 118—124.
15. Clardy J., Fischbach M.A., Currie C.R. The natural history of antibiotics. *Curr Biol* 2009; 19: 11: 437—441.
16. Coates A.R., Hu Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 8: 1147—1154.
17. Aminov R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* 2010; 1: 134: 1—7.
18. Brötz-Oesterhelt H., Sass P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. *Future Microbiol* 2010; 5: 10: 1553—1579.
19. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. 6-е изд. 2004. М.: Изд. МГУ; Наука, 528. / Egorov H.S. Osnovy uchenija ob antibiotikah. 6-e izd. 2004. M.: Izd. MGU; Nauka, 528. [in Russian]
20. Koehn F.E. High impact technologies for natural products screening. *Prog Drug Res* 2008; 65: 177—210.
21. Molinari G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. *Adv Exp Med Biol* 2009; 655: 13—27.
22. Donadio S., Maffioli S., Monciardini P. et al. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *J Antibiot (Tokyo)* 2010; 63: 8: 423—430.
23. Genilloud O., González I., Salazar O. et al. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38: 3: 375—389.
24. Leeds J.A., Schmitt E.K., Krastel P. Recent developments in antibacterial drug discovery: microbe-derived natural products—from collection to the clinic. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15: 3: 211—226.
25. Li J.W., Vederas J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 2009; 325: 5937: 161—165.
26. Somanadhan B., Kotturi S.R., Leong C. Y. et al. Isolation and synthesis of falcitidin, a novel myxobacterial-derived acyltetrapeptide with activity against the malaria target falcipain-2. *J Antibiot (Tokyo)* 2013; 66: 5: 259—264.
27. Singh S.B., Young K. New antibiotic structures from fermentations. *Expert Opin Ther Pat* 2010; 20: 10: 1359—1371.
28. Sunazuka T., Hirose T., Omura S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. *Acc Chem Res* 2008; 41: 2: 302—314.
29. Сазыкин Ю.О., Бибикова М.В., Иванов В.П. и др. Технология скрининга вторичных микробных метаболитов: к эволюции методологии. *Антибиотики и химиотер* 2002; 47: 10: 25—31. / Sazykin Ju.O., Bibikova M.V., Ivanov V.P. i dr. Tehnologija skringinga vtorichnyh mikrobnyh metabolitov: k jevoljucii metodologii. *Antibiotiki i himioter* 2002; 47: 10: 25—31. [in Russian]
30. Фефилова Е.П., Алехин А.И., Гончаров Н.Г. и др. Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных препаратов из мицелиальных грибов. М.: Национальная академия микологии: 2013; 152. / Feofilova E.P., Alehin A.I., Goncharov N.G. i dr. Fundamental'nye osnovy mikologii i sozdanie lekarstvennyh preparatov iz micelial'nyh gribov. M.: Nacional'naja akademija mikologii: 2013; 152. [in Russian]
31. Yamazaki Y., Someno T., Igarashi M. et al. Androstamides A and B, the new anti-prostate cancer agents produced by *Streptomyces* sp. MK932-CF8. *J Antibiot (Tokyo)* 2015; 68: 4: 279—285.
32. Singh S.B., Pelaez F. Biodiversity, chemical diversity and drug discovery. *Prog Drug Res* 2008; 65: 141: 143—174.
33. Zanella F., Lorens J.B., Link W. High content screening: seeing is believing. *Trends Biotechnol* 2010; 28: 5: 237—245.
34. Berrue F., Withers S.T., Haltli B. et al. Chemical screening method for the rapid identification of microbial sources of marine invertebrate-associated metabolites. *Mar Drugs* 2011; 9: 3: 369—381.
35. Blondelle S.E., Lohner K. Optimization and high-throughput screening of antimicrobial peptides. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 28: 3204—3211.
36. Alksne L.E., Dunman P.M. Target-based antimicrobial drug discovery. *Methods Mol Biol* 2008; 431: 271—283.
37. Тренин А.С. Микробные модели в поиске ингибиторов биосинтеза стеролов. *Антибиотики и химиотер* 2013; 58: 7—8: 3—14. / Trenin A.S. Mikrobnye modeli v poiske ingibitorov biosinteza sterolov. *Antibiotiki i himioter* 2013; 58: 7—8: 3—14. [in Russian]
38. Rahman H., Austin B., Mitchell W.J. et al. Novel anti-infective compounds from marine bacteria. *Mar Drugs* 2010; 8: 3: 498—518.
39. Tiwari K., Gupta R.K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit Rev Biotechnol* 2012 Jun; 32: 2: 108—132.
40. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 4: 669—685.
41. Hu Y., Shamaei-Tousi A., Liu Y., Coates A. A new approach for the discovery of antibiotics by targeting non-multiplying bacteria: a novel topical antibiotic for staphylococcal infections. *PLoS One* 2010; 5: 7: P.e11818.
42. Gillespie D.E., Brady S.F., Bettermann A.D. et al. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 9: 4301—4306.
43. Brady S.F., Simmons L., Kim J.H., Schmidt E.W. Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms. *Nat Prod Rep* 2009; 26: 11: 1488—1503.
44. Hirota-Takahata Y., Kozuma S., Kuraya N. et al. Pedopeptins, novel inhibitors of LPS: Taxonomy of producing organism, fermentation, isolation, physicochemical properties and structural elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* 2014; 67: 3: 243—251.
45. Raina S., De Vizio D., Odell M. et al. Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? *Biotechnol Appl Biochem* 2009; 54: 2: 65—84.
46. Sanchez S., Demain A.L. Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *Microb Biotechnol* 2008; 1: 4: 283—319.
47. Amano S.I., Sakurai T., Endo K. et al. A cryptic antibiotic triggered by monensin. *J Antibiot (Tokyo)* 2011; 64: 10: 703.
48. Булакова, В. Г., Виноградова К. А., Орлова, Т. И. и др. Действие антибиотиков как сигнальных молекул. *Антибиотики и химиотер* 2014; 59: 1—2: 36—43. / Bulgakova, V. G., Vinogradova K. A., Orlova, T. I. i dr. Dejstvie antibiotikov kak signal'nyh molekul. *Antibiotiki i himioter* 2014; 59: 1—2: 36—43. [in Russian]
49. Challis G.L., Hopwood D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: Suppl 2: 14555—14561.
50. Rigali S., Tütemeyer F., Barends S. et al. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep* 2008; 9: 7: 670—675.
51. Sánchez S., Chávez A., Forero A. et al. Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot (Tokyo)* 2010; 63: 8: 442—459.
52. Стоянова Л. Г., Левина Н.В. Регуляция синтеза бактериоцина рекомбинантного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116 компонентным составом среды. *Микробиология*. 2006; 75: 3: 286—291. / Stojanova L. G., Levina N.V. Regulacija sinteza bakteriocina rekombinantnogo shtamma *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116 komponentnym sostavom sredy. *Mikrobiologija*. 2006; 75: 3: 286—291.
53. Ruiz B., Chávez A., Forero A. et al. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36: 2: 146—167.
54. Dietz W.A., Witholt B. Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. *Biochem Eng J* 2001; 7: 113—115.
55. Dieting U., Trauthwein H., Zimmermann H. High-throughput screening in the climatic chamber. *Elements Degussa Sci News* 2005; 11: 14—18.
56. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard 2nd edn CLSI document M27—A2 Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2002.
57. Кубанова А.А., Степанова Ж.В., Гуськова Т.А. и др. Методические указания по изучению противогрибковой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012; 944: 578—586. / Kubanova A.A., Stepanova Zh.V., Gus'kova T.A. i dr. Metodicheskie ukazaniya po izucheniju protivogribkovoj aktivnosti lekarstvennyh sredstv. V kn.: Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaja / Pod red. A.N. Mironova. M.: Grif i K, 2012; 944: 578—586. [in Russian]
58. Тренин А.С. Микробная тест-система для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. *Антибиотики и химиотер* 2013; 58: 3—4: 3—9. / Trenin A.S. Mikrobnaja test-sistema dlja poiska ingibitorov biosinteza sterolov. *Antibiotiki i himioter* 2013; 58: 3—4: 3—9. [in Russian]

59. Тренин А.С. Микробная модель *Halobacterium salinarum* для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 5–6: 3–10. / Trenin A.S. Mikrobnaja model' Halobacterium salinarum dlja poiska ingibitorov biosinteza sterolov. Antibiotiki i himioter 2013; 58: 5–6: 3–10. [in Russian]
60. Тренин А.С., Цвигун Е.А., Бычкова О.П., Лавренов С.Н. Микробная модель *Halobacterium salinarum* в отборе синтетических аналогов антибиотика турбомидина А, обладающих противоопухолевым действием. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 9–10: 3–7. / Trenin A.S., Cvigun E.A., Bychkova O.P., Lavrenov S.N. Mikrobnaja model' Halobacterium salinarum v otdore sinteticheskikh analogov antibiotika turbomicina A, obladaushchih protivopuholevym dejstviem. Antibiotiki i himioter 2013; 58: 9–10: [in Russian]
61. Bode H.B., Bethe B., Huys R., Zeek A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBiochem* 2002; 3: 7: 619–627.
62. Hopwood D.A. Cracking the polyketide code. *PLoS Biol.* 2004. V.2. N.2. E35. P.0166–0169. — Режим доступа: 10.1371/journal.pbio.0020035 — PMID:14966534.
63. Kotowska M. Application of molecular biology for the discovery of biosynthetic genes of polyketide and peptide antibiotics produced by actinomycetes. *Postepy Biochem* 2005; 51: 3: 345–352.
64. Егоров А.М. Антибиотики: прошлое, настоящее и будущее препаратов для лечения инфекционных болезней. Вестник науч центра экспер средств мед прим 2007; 3: 1–6. / Egorov A.M. Antibiotiki: proshloe, nastojashhee i budushhee preparatov dlja lechenija infekcionnyh boleznej. Vedom nauch centra jeksper sredstv med prim 2007; 3: 1–6. [in Russian]
65. Medema M.H., Kottmann R., Yilmaz P. et al. Minimum information about a biosynthetic gene cluster. *Nat Chem Biol* 2015 Aug; 11: 9: 625–631.
66. Olano C., Méndez C., Salas J.A. Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. *Microb Biotechnol* 2011; 4: 2: 144–164.
67. Nishida H., Beppu T., Ueda K. Whole-genome comparison clarifies close phylogenetic relationships between the phyla Dictyoglomi and Thermotogae. *Genomics*. 2011. Nov; 98: 5: 370–375.
68. Ma S.M., Li J.W., Choi J.W. et al. Complete reconstitution of a highly reducing iterative polyketide synthase. *Science* 2009; 326: 5952: 589–592.
69. Caffrey P., Aparicio J.F., Malpartida F., Zotchev S.B. Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents. *Curr Top Med Chem* 2008; 8: 8: 639–653.
70. Schirmer A., Gadkari R., Reeves C.D. et al. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8: 4840–4849.
71. Hopwood D.A. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Mol Microbiol* 2007; 63: 4: 937–940.
72. Méndez C., Künzel E., Lipata F. et al. Ovidomycin, an unusual angucyclinone encoded by genes of the oleandomycin-producer *Streptomyces antibioticus* ATCC11891. *J Nat Prod* 2002; 65: 5: 779–782.
73. Shawky R.M., Puk O., Wietzorrek A. et al. The border sequence of the balhimycin biosynthesis gene cluster from *Amycolatopsis balhimycina* contains bbr, encoding a StrR-like pathway-specific regulator. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007; 13: 1–3: 76–88.
74. Gupta S.K., Padmanabhan B.R., Diene S.M. et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 1: 212–220.
75. Преображенская М.Н., Олсуфьева Е.Н., Тевяшова А.Н. et al. Synthesis and study of the antifungal activity of new mono- and di-substituted derivatives of a genetically engineered polyene antibiotic 28, 29-didehydro nystatin A1 (S44HP). *J Antibiot (Tokyo)* 2010; 63: 2: 55–64.
76. Maccone A.B., Caruso B.K., Leahy R.G. et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of omadacycline, a novel aminomethylcycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 2: 1127–1135.
77. Chen X., Wei P., Fan L. et al. Generation of high-yield rapamycin-producing strains through protoplasts-related techniques. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 83: 3: 507–512.
78. Тренин А.С., Федорова Г.Б., Лайко А.В., Дудник Ю.В. Увеличение продукции эремомидина в результате регенерации и УФ-облучения протопластов *Amycolatopsis orientalis* subsp. *eremomycini*. Антибиотики и химиотер 2001; 46: 3: 6–11. / Trenin A.S., Fedorova G.B., Lajko A.V., Dudnik Ju.V. Uvelichenie produkcii jeremomicina v rezul'tate regeneracii i UF-oblucheniya protoplastov Amycolatopsis orientalis subsp. eremomycini. Antibiotiki i himioter 2001; 46: 3: 6–11. [in Russian]
79. Nakashima T., Iwatsuki M., Ochiai J. et al. Mangromicins A and B: structure and antitrypanosomal activity of two new cyclopentadecane compounds from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. *J Antibiot (Tokyo)* 2014; 67: 3: 253–260.
80. Testa C.A., Johnson L.J. A whole-cell phenotypic screening platform for identifying methylerythritol phosphate pathway-selective inhibitors as novel antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 Sep; 56: 9: 4906–4913.
81. Kahan B.D. Forty years of publication of transplantation proceedings—the second decade: the cyclosporine revolution. *Transplant Proc* 2009; 41: 5: 1423–1437.
82. 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 (Tokyo)* 2007; 60: 1: 1–12.
83. Hiramatsu K., Igarashi M., Morimoto Y. et al. Curing bacteria of antibiotic resistance: reverse antibiotics, a novel class of antibiotics in nature. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39: 6: 478–485.
84. Bugg T.D., Braddick D., Dowson C.G., Roper D.I. Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends Biotechnol* 2011; 29: 4: 167–173.
85. Бибиčkova М.В., Грамматикова Н.Э., Катлинский А.В. и др. Влияние природных гипополипидемических соединений на формирование биоплёнок штаммами рода *Pseudomonas*. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 1–2: 10–13. / Bibikova M.V., Grammatikova N.Je., Katlinskij A.V. i dr. Vlijanie prirodnyh gipopolipidemicheskikh soedinenij na formirovanie biopljonok shtammami roda Pseudomonas. Antibiotiki i himioter 2009; 54: 1–2: 10–13. [in Russian]
86. Тренин А.С., Терехова Л.П., Толстых И.В. и др. Отбор микробных вторичных метаболитов — ингибиторов биосинтеза холестерина с помощью культуры клеток гепатобластомы G2. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 1: 3–8. / Trenin A.S., Terehova L.P., Tolstyh I.V. i dr. Otdor mikrobnnyh vtorichnyh metabolitov — ingibitorov biosinteza holesterina s pomoshh'ju kul'tury kletok hepatoblastomy G2. Antibiotiki i himioter 2003; 48: 1: 3–8. [in Russian]
87. Arai Y., Inuma H., Ikeda Y. et al. Migracins A and B, new inhibitors of cancer cell migration, produced by *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo)* 2013; 66: 4: 225–230.
88. Moy T.I., Conery A.L., Larkins-Ford J. et al. High-throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model. *ACS Chem Biol* 2009; 4: 7: 527–533.
89. Zhang B., Watts K.M., Hodge D. et al. A second target of the antimalarial and antibacterial agent fosmidomycin revealed by cellular metabolic profiling. *Biochemistry* 2011; 50: 17: 3570–3577.
90. Soppa J. From genomes to function: *Haloarchaea* as model organisms. *Microbiology* 2006; 152: 3: 585–590.
91. Терехова Л.П., Галатенко О.А., Тренин А.С. и др. Выделение и изучение антибиотика ИНА-1132 (хлоротрицина), образуемого штаммом *Streptomyces baarnensis*. Антибиотики и химиотер 2008; 53: 7–8: 3–7. / Terehova L.P., Galatenko O.A., Trenin A.S. i dr. Vydelenie i izuchenie antibiotika INA-1132 (hlorotricina), obrazuemogo shtammom Streptomyces baarnensis. Antibiotiki i himioter 2008; 53: 7–8: 3–7 [in Russian]
92. Шашков А. С., Цветков Д. Е., Лапчинская О. А. и др. Строение, спектры ЯМР ¹H и ¹³C и биологическая активность антибиотика ИНА-1278, родственного ирумамидину и продуцируемого экспериментальным штаммом *Streptomyces* sp. № 1278. Известия РАН. Серия химическая. 2011; 60: 11: 2365–2370. / Shashkov A. S., Svetkov D. E., Lapchinskaja O. A. i dr. Stroenie, spektry JaMR ¹H i ¹³S i biologicheskaja aktivnost' antibiotika INA-1278, rodstvennogo irumamicinu i produciruemogo jeksperimental'nym shtammom Streptomyces sp. № 1278. Izvestija RAN. Serija himicheskaja. 2011; 60: 11: 2365–2370.
93. Тренин А.С., Кац Н.Ю., Цвигун Е.А., Бычкова О.П., Краснополянская Л.М. Базидиальные грибы *Kuehneromyces mutabilis*, *Flammulina velutipes* и *Lentinus edodes*, как возможные продуценты ингибиторов биосинтеза стеролов. Успехи мед микол 2014; 12: 353–354. / Trenin A.S., Kac N.Ju., Cvigun E.A., Bychkova O.P., Krasnopol'skaja L.M. Bazidial'nye griby Kuehneromyces mutabilis, Flammulina velutipes i Lentinus edodes, kak vozmozhnye producenty ingibitorov biosinteza sterolov. Uspehi med mikol 2014; 12: 353–354. [in Russian]
94. Степанова Е.В., Штиль А.А., Лавренов С.Н. и др. Соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилиа — новый класс противоопухолевых соединений. Известия Академии наук. Серия химическая. 2010; 12: 1–9. / Stepanova E.V., Shtil' A.A., Lavrenov S.N. i dr. Soli tris(1-alkilindol-3-il)metilija — novyj klass protivopuholevyh soedinenij. Izvestija Akademii nauk. Serija himicheskaja. 2010; 12: 1–9. [in Russian]
95. Yao X., Li C., Zhang J., Lu C.D. r-Glutamyl spermine synthetase PauA2 as a potential target of antibiotic development against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 10: 5309–5314.
96. Huband M.D., Bradford P.A., Otterson L.G. et al. In vitro antibacterial activity of AZD0914, a new spiropyrimidinetrione DNA gyrase/topoisomerase inhibitor with potent activity against gram-positive, fastidious gram-negative, and atypical bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 1: 467–474.

97. Therien A.G., Huber J.L., Wilson K.E. et al. Broadening the spectrum of β -lactam antibiotics through inhibition of signal peptidase type I. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 9: 4662–4670.
98. Cox G., Koteva K., Wright G.D. An unusual class of anthracyclines potentiate gram-positive antibiotics in intrinsically resistant gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 7: 1844–1855.
99. Cushnie T.P., Cushnie B., Lamb A.J. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44: 5: 377–386.
100. Otto M.P., Martin E., Badiou C. et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 7: 1524–1532.
101. Diep B.A., Afasizheva A., Le H.N., et al. Effects of linezolid on suppressing *in vivo* production of staphylococcal toxins and improving survival outcomes in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. *J Infect Dis* 2013; 208:1: 75–82.
102. Khodaverdian V., Pesho M., Truitt B. et al. Discovery of antivirulence agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 8: 3645–3652.
103. Maiolo E.M., Furustrand Tafin U., Borens O., Trampuz A. Activities of fluconazole, caspofungin, anidulafungin, and amphotericin B on planktonic and biofilm *Candida* species determined by microcalorimetry. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 5: 2709–2717.
104. Arita-Morioka K., Yamanaka K., Mizunoe Y. et al. Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 1: 633–641.
105. Baugh S., Phillips C.R., Ekanayaka A.S. et al. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 3: 673–681.
106. Marcone G.L., Carrano L., Marinelli F., Beltrametti F. Protoplast preparation and reversion to the normal filamentous growth in antibiotic-producing uncommon actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 2010; 63: 2: 83–88.
107. Walkty A., Adam H., Baxter M. et al. *In vitro* activity of plazomicin against 5,015 gram-negative and gram-positive clinical isolates obtained from patients in canadian hospitals as part of the CANWARD study, 2011–2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 5: 2554–2563.
108. Huang E., Yousef A.E. Paenibacterin, a novel broad-spectrum lipopeptide antibiotic, neutralises endotoxins and promotes survival in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44: 1. P.74–77.
109. Qian C.D., Wu X.C., Teng Y. et al. Battacin (Octapeptin B5), a new cyclic lipopeptide antibiotic from *Paenibacillus tianmuensis* active against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 3: 1458–1465.
110. Hernandez V., Crépin T., Palencia A. et al. Discovery of a novel class of boron-based antibacterials with activity against gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 3: 1394–1403.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Тренин Алексей Сергеевич — д.б.н., заведующий сектором Разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе»

Вторичные метаболиты морских микроорганизмов.

I. Вторичные метаболиты морских актиномицетов

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

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

Secondary Metabolites from Marine Microorganisms.

I. Secondary Metabolites from Marine Actinomycetes

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

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

В обзоре представлены опубликованные в период с 2007 по 2014 гг. данные по вторичным метаболитам, синтезируемым определённой группой морских микроорганизмов — морскими актиномицетами. По химической структуре описанные метаболиты относятся к разным классам соединений и проявляют различную биологическую активность. Ряд метаболитов обладает антибиотическим действием в отношении бактерий, в том числе устойчивых патогенов, а также вирусов и грибов. Многие морские актиномицеты являются продуцентами цитотоксических соединений, проявляющих противораковую активность, а также синтезируют вещества — ингибиторы различных групп ферментов.

Ключевые слова: морские микроорганизмы, актиномицеты, вторичные метаболиты.

Review represents data on new active metabolites isolated from marine actinomycetes published in 2007 to 2014. Marine actinomycetes are an unlimited source of novel secondary metabolites with various biological activities. Among them there are antibiotics, anticancer compounds, inhibitors of biochemical processes.

Key words: marine microorganisms, marine actinomycetes, secondary metabolites.

Биоресурсы мирового океана использовались человеком с незапамятных времен, но сферой интересов были промысловые зверь и рыба, моллюски, водоросли и др. К морским микроорганизмам научный и промышленный интерес пробудился в середине прошлого века, хотя отдельные научные работы опубликованы ранее [1, 2]. Побудительной причиной интереса к морским микроорганизмам явилось то обстоятельство, что антибиотики, продуцентами которых были почвенные микроорганизмы (грибы, бактерии, актиномицеты), постепенно переставали быть эффективными ингибиторами патогенов в результате возникновения антибиотикорезистентности. Теперь выделить из почвенных образцов продуценты новых эффективных антибиотиков удастся крайне редко [3, 4].

Мировой океан является природной нишей микроорганизмов. Среда их обитания характеризуется экстремальными условиями: высокое гидростатическое давление, низкая температура и изменяющаяся солёность воды, отсутствие света, изменяющаяся

концентрация кислорода, нерегулярное поступление питательных веществ [5, 6]. Лишь незначительная часть обнаруженных микроорганизмов может быть культивирована в лабораторных условиях.

Разнообразие микроорганизмов морской среды, их способность синтезировать различные метаболиты с разной биологической активностью, в том числе антибиотики, привлекли внимание микробиологов, химиков, биотехнологов. Микробиология и химия вторичных метаболитов морских микроорганизмов стали развиваться быстрыми темпами, и к концу прошлого века сформировалось научно-практическое направление — морская биотехнология, выразившаяся в комплексном изучении морских микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, роли симбиоза микроорганизмов с моллюсками в биосинтезе вторичных метаболитов [7—10].

Значительным вкладом в изучение биологии морских микроорганизмов и исследование их биосинтетической активности, а также в разработку проблем морской биотехнологии является создание в лаборатории морской микробиологии Тихоокеанского института биоорганической химии РАН большой коллекции морских микроорганизмов [11].

© Коллектив авторов, 2015

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

В последние годы разработаны быстрые методы обнаружения продуцентов потенциально интересных вторичных метаболитов. Суммарную ДНК, выделенную непосредственно из проб окружающей среды (экологическая ДНК), клонируют в легко культивируемые бактерии, выделяют клоны, продуцирующие вторичные метаболиты или содержащие гены биосинтеза этих метаболитов, сгруппированные на бактериальных хромосомах [12, 13]. Создаются метагеномные библиотеки, содержащие эти гены, что дает возможность выявлять потенциальные продуценты ещё на стадии ДНК, до культивирования микроорганизма.

Разработан автоматический метод экстракции ДНК, методы компьютерной идентификации и анализа отдельных поликетидсинтетаз (ПКС) в единой цепочке, а также расположение последовательностей нуклеотидов, кодирующих мультимодульные ПКС, включая гибридные ПКС/нерибосомальные пептидсинтетазы. Установлено, что последовательности ПКС кластируются согласно структурному сходству между их поликетидными продуктами [14].

Для обнаружения продуцентов метаболитов с конкретными желаемыми биохимическими активностями требуется разработка специфических моделей — «активный скрининг». Так, продуцент ацилариламидов получен при скрининге актиномицетов на клетки рака лёгкого [15]. Диазахиномицины E-G получены при скрининге морских актиномицетов на устойчивые к цис-платине раковые клетки яичников [16]. Скрининг микроорганизмов — продуцентов гиалуронидазы проводился с использованием мембранной фракции CD44-клеток и флуоресцентных конъюгатов [17].

Для быстрого скрининга и идентификации метаболитов предложено использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией. Этот же метод может быть применен при подборе оптимальных условий культивирования [18]. Создаются библиотеки вторичных метаболитов (спектры поглощения, время вымывания при жидкостной хроматографии).

Экспериментальный и обзорный материал, касающийся вторичных метаболитов морских микроорганизмов, чрезвычайно обширен, поэтому в предлагаемой обзорной статье представлены данные только о морских актиномицетах (продуценты, вторичные метаболиты и их биологическая активность), опубликованные в период 2007—2014 гг. Аналогичные вопросы обсуждаются и другими авторами [7, 9, 19, 20].

1. Морские актиномицеты

Морские актиномицеты обитают в основном в донных отложениях морей, предпочитая слабо-

кислый pH воды. Их также находят в тканях морских беспозвоночных (морские звезды, губки, моллюски), с которыми актиномицеты находятся в симбиозе [8—10]. Актиниомыцеты являются активными компонентами морских микробных сообществ, образуют стабильные популяции в различных экосистемах и синтезируют различные вторичные метаболиты.

Экологическая роль актиномицетов в мировом океане значительна. Они медленно разрушают различные материалы, расщепляют и рециклизируют органические соединения, инициируют минерализацию органических остатков, фиксацию азота, выделяют целлюлолитические и хитинолитические ферменты, щелочную фосфатазу, щелочную амилазу, рибонуклеазу [12].

Значительная часть выделенных морских актиномицетов имеет близких родственников среди сухопутных актиномицетов, синтезирует те же вторичные метаболиты, но их разнообразие у морского варианта больше и в образуемой ими смеси практически всегда присутствуют еще 1—5 новых компонентов — вариантов общей структуры.

2. Вторичные метаболиты

Новые вторичные метаболиты из морских актиномицетов, обнаруженные в указанный период, в предлагаемой статье сгруппированы по принципу сходства химических структур у метаболитов разных продуцентов.

В связи с тем что интерес к новым вторичным метаболитам, синтезируемым морскими актиномицетами, обусловлен, прежде всего, биологической активностью этих соединений, классификация описанных метаболитов по характеру их биологического действия параллельно приведена в таблицах 1—3.

2.1. Дикетопиперазины

2,5-дикетопиперазины (ДКП) представляют собой десятичленные азотсодержащие циклические соединения, образованные двумя аминокислотами за счёт карбоксильной группы одной аминокислоты и аминной группы второй аминокислоты. Структурное разнообразие ДКП обусловливается разнообразием образующих их аминокислот и последующей модификацией молекулы (образование гетероциклов, пренилирование, окисление, димеризация).

Модифицированные ДКП сохраняют конформационную устойчивость гетероциклического ядра, устойчивы к протеолизу, сохраняют фармакодинамические и фармакокинетические характеристики. Многие ДКП обладают селективными биологическими свойствами.

Из австралийских морских донных отложений выделен актиномицет *Nocardioopsis* sp. CMV NQ 232, образующий нокардиоазины A и B, но-

Таблица 1. Антимикробные и противовирусные метаболиты (2007–2014 гг.)

Метаболит	Спектр действия	Продуцент	Ссылки
Абиссомицин	MRSA	<i>Verrucospora</i> AB-18-032	[50]
Аренимицин	Грамположительные бактерии, микобактерии MRSA	<i>Salinispora arenicola</i>	[44]
Виолапироны A-G	Слабая антимикробная активность	<i>Streptomyces violascens</i>	[25]
Дариамиды A-C	Слабая активность против <i>C.albicans</i>	<i>Streptomyces</i> sp. CNQ 085	[46]
Дикетопиперазины 1-5	Антивирусная активность (H1N1)	<i>Streptomyces</i> sp. FXJ.17328	[24]
Кабоксамицин	Слабая антимикробная активность	<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	[69]
Ладжолламицин	Грамположительные бактерии с множественной устойчивостью	<i>Streptomyces nodosus</i>	[62]
Лобофорины 2-5	Микобактерии, <i>B.subtilis</i> , <i>P.vulgaris</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	[60]
Майамицин	Грамположительные бактерии с множественной устойчивостью	<i>Streptomyces</i> sp. NB 202	[49]
Маринопирролы	MRSA	<i>Streptomyces</i> sp. NCQ-418	[36]
Моллемицины	Антибактериальная активность, действие на малярийный плазмодий	<i>Streptomyces</i> sp. CMB MO244	[54]
Напиродиомицин	Антибактериальная активность	<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 10428	[74]
Неомаклафунгины	<i>Trichophyton mentagrophites</i>	<i>Actinoalloteichus</i> sp. NPS 702	[57]
Ноказины A-C	Слабая антимикробная активность	<i>Nocardiosis dassonvillei</i> NR-10-5	[22]
Нокардиамиды	Слабая антимикробная активность	<i>Nocardiosis</i> sp. CNXO 37	[66]
Стрептомицинол	Виды <i>Pseudomonas</i> , <i>C.albicans</i>	<i>Streptomyces</i> sp. DA 22	[40]
Стрептофеназины A-H	Антибактериальная активность	<i>Streptomyces</i> sp.	[77]
Херонапирролы	Грамположительные бактерии	<i>Streptomyces</i> sp. CMB-MO 423	[34]

Таблица 2. Метаболиты, обладающие цитотоксической активностью (2007–2014 гг.)

Метаболит	Продуцент	Ссылки
Производное антрацена	<i>Streptomyces</i> sp.W007	[72]
Дариамиды A-C	<i>Streptomyces</i> sp.CNQ 085	[46]
Диахиномицины E-G	Морские актиномицеты	[16]
Кабоксамицин	<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	[69]
Ладжолламицин	<i>Streptomyces nodosus</i>	[62]
Лобофорины C-D	<i>Streptomyces carnosus</i> AZS17	[61]
Майамицин	<i>Streptomyces</i> sp. HB 202	[49]
Мансурамицины A-C	<i>Streptomyces</i> sp. Me 137	[41]
Маринактиноны A-C	<i>Marinactinospora thermotolerans</i> SCSIO 00606	[27]
Напиродиомицин	<i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 10428	[74]
Нитропиридин D	<i>Actinomyces</i> sp. CMQ-509	[35]
Проксимицины	<i>Actinomyces verrucosipora</i>	[64]
РМО 70747	<i>Saccharopolyspora taberi</i> PEM-06-F23-019B	[43]
Стрептокарбазол A	<i>Streptomyces</i> sp. F.MA	[38]
Тартролон D	<i>Streptomyces</i> sp. MDG 04 17-069	[55]
Урактапелстатин A	<i>Mechercharimyces asporophorigeneus</i> YM-11-542	[67]
Усабамицин	<i>Streptomyces</i> sp. NPS 853	[70]
Церуломицины 1-5	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> WH-1-2216-6	[29]

Таблица 3. Метаболиты — ингибиторы метаболических процессов (2007–2014 гг.)

Метаболит	Мишень действия	Продуцент	Ссылки
Абиссомицин	Биосинтез <i>p</i> -NH ₂ -бензойной кислоты	<i>Verrucospora</i> AB-18-032	[50]
Альбидопирон	Тирозин-фосфатазы	<i>Streptomyces</i> sp.NTK 227	[26]
Анминденолы A и B	Индукцибельная азотоксидаза	Морской актиномицет	[53]
Бафиломицин L	Синтез холестерина	<i>Streptomyces</i> sp.OPMA 00072	[58]
Бахамолид A	Изоцитрат-лиазы	<i>Streptomyces</i> sp.CNQ 343	[59]
Гиалуромицин	Гиалуронидаза	<i>Streptomyces</i> sp. CNT 372	[17]
Дермакозины A-C	Антиоксиданты	<i>Dermacoccus abyssi</i>	[76]
Кабоксамицин	Фосфо-диэстеразы	<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	[69]
Маринактиноны A-C	Топоизомераза	<i>Marinactinospora thermotolerans</i> SCSIO 00606	[27]
Нокардиоазины	Мембранный белок Р гликопротеин	<i>Nocardiosis</i> Mo 232	[21]
Нокатрионы A и B	Фотопротекторы	<i>Nocardiosis</i> KMT-002	[71]
Ракицидин D	Миграция раковых клеток	<i>Streptomyces</i> sp.	[65]
Усабамицины	Захват серотонина	<i>Streptomyces</i> sp.NP5 853	[70]
Фрадкарбазолы A-C	Киназы поликетидсинтетазы	<i>Streptomyces fradiae</i> 007 M 135	[39]
Церуломицины 1-5	Иммунодепрессанты	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> WH-1-2216-6	[29]

вый класс пренилированных ДКП. Биосинтез осуществляется действием индола на ДКП уникального региоселективного фермента ДКП-индол-пренилтрансферазы. Нокардиоазин А не цитотоксичен, но ингибирует активность мембранного гликобелка Р — эффлюкс-насоса, чем препятствует выбросу лекарственных препаратов из клетки. В частности, под действием нокардиоазина А прекращается выброс противоопухолевого антибиотика доксорубина из раковой клетки, которая становится чувствительной к препарату. Авторы считают, что нетоксичность нокардиоазинов для клеток обусловлена центральным положением ДКП в молекуле метаболита, мостиком между двумя остатками пренилированных частей молекулы [21].

Три новых производных ДКП — ноказины А-С получены при культивировании морского актиномицета *Nocardioopsis dassonvillei* NR10-5. ДКП образованы ароматическими аминокислотами близкой структуры. Метаболиты не обладают цитотоксической активностью [22].

Морской стрептомицет *Streptomyces* sp. CMВ MQO30, выделенный из морских отложений, на среде с морской водой образует два метаболита — насесиазины 1 и 2. Молекула каждого из них состоит из двух субъединиц — А и В. В молекуле 1 субъединица А представляет собой D-аланил-D-триптофанил-ДКП, субъединица В — L-пролил-L-триптофанил-ДКП. Субъединицы связаны между собой необычной связью: между С-3 субъединицы А и ароматическим циклом триптофана субъединицы В. Соединения 1 и 2 имеют идентичные субъединицы В. Субъединицы А у 2 отличаются от субъединиц А у 1 замещением D-аланина на D-пролин.

Насесиазины 1 и 2 не обнаружили ни антимикробных, ни цитотоксических свойств, однако представляют интерес в качестве возможной основы для полусинтетических препаратов [23]. Из-за необычной связи между субъединицами эти вещества являются чрезвычайно редкими среди класса димерных ДКП.

Streptomyces sp. FXS7328, выделенный из морских донных отложений, в лабораторных условиях образует 10 ДКП, из которых 5 получены и описаны впервые (рис. 1). По версии авторов в биосинтезе этих ДКП участвуют 6 аминокислот Phe, Tyr, His, Leu, iLeu, Val. Первоначально образуются ДКП Phe — Leu, Tyr — Leu, His — Leu, iLeu — Phe, Phe — Val. В результате модификации этих ДКП (N-метилирование и последующее дегидрогенирование, окисление, гидроксилирование, инверсия двойной связи) в конечном счёте образуется большое разнообразие данных метаболитов, из которых три соединения обладают сильным антивирусным действием в отношении вируса гриппа H1N1. Как следует из анализа соотношения структура — антиви-

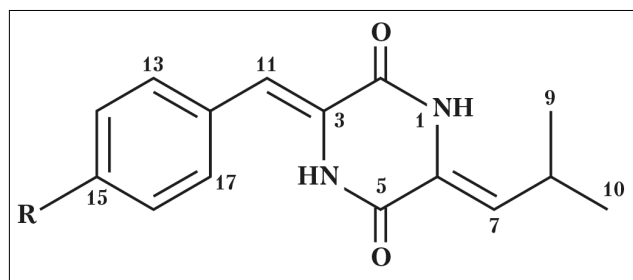


Рис. 1. Структура дикетопиперазина 3 [24].

русная активность, для проявления активности необходимо присутствие в молекуле модифицированного ДКП дегидрогенированного фенилаланина и лейцина или дегидрогенированного лейцина. Дегидрогенирование лейцина увеличивает антивирусную активность, в то время как гидроксилирование дегидрогенированного фенилаланина или дегидрогенированного лейцина, инверсия двойной связи или N-метилирование сокращают её.

Пять новых ДКП не проявляли цитотоксичности, а также антимикробной активности [24].

2.2. Производные α - и γ -пиранов

α - и γ -Пираны представляют класс шестичленных лактонов, которые являются субструктурами различных природных продуктов и широко распространены в животных и растительных тканях, бактериях и др. Эти природные продукты проявляют различную биологическую активность — цитотоксичность, нейротоксичность, антифунгальное действие.

Шестичленные циклы пиранов образованы пятью атомами углерода и одним атомом кислорода, второй атом кислорода образует карбонильную группу. α - и γ -пираны различаются относительным расположением кислорода в циклической и карбонильной части молекулы.

Три новых производных α -пирана (нокапираны) получены при выращивании морского актиномицета *Nocardioopsis dassonvillei* HR 10-5 в присутствии новых производных ДКП (ноказинов). Однако интересных активностей не было обнаружено [22].

Семь производных α -пирана (виолапираны) были получены при культивировании *Streptomyces violascens*, выделенного из *Hylobates hoolock*.

Эти производные в качестве заместителей содержали углеводородные цепи с 10—12 атомами углерода, три соединения содержали карбонильные или гидроксильные группы в углеродных цепях. Лишь одно соединение проявило умеренную активность против *Bac.subtilis* [25].

Альбидопирон, новый α -пирансодержащий метаболит, синтезируется морским актиномицетом *Streptomyces* sp. N_{тк}227, выделенным из дон-

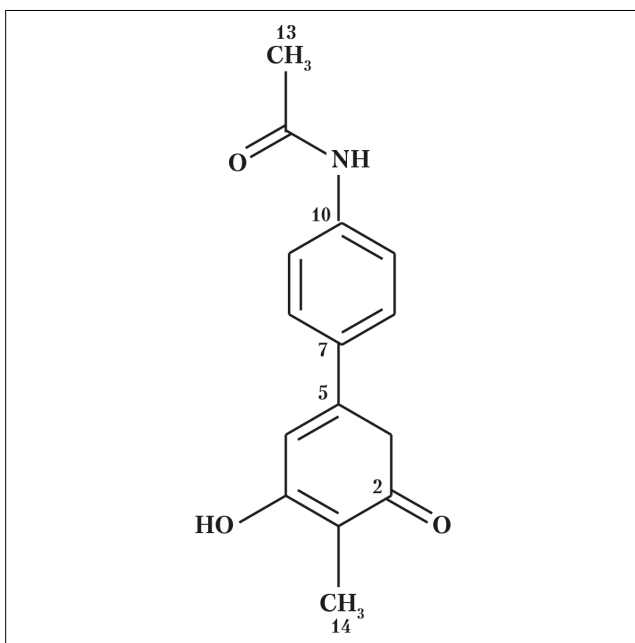


Рис. 2. Структура альбидопирона [26].

ных отложений Атлантического океана. Химическая структура альбидопирона представляет собой шестичленный ароматический лактон, в положении 3 которого присутствует метильная группа, в положении 4 — ОН-группа, в положении 6 — остаток анилинамида уксусной кислоты (рис. 2). Альбидопирон не является антибиотиком, но ингибирует активность тирозинфосфатазы В (ТФВ), которая вместе с тирозинкиназами регулирует обратимое фосфорилирование тирозина, важное для регуляции клеточных сигнальных систем. ТФВ — главный негативный регулятор инсулина (регулирует фосфорное состояние рецептора инсулина). В связи с этим ингибиторы ТФВ являются эффективными агентами для лечения диабета [26].

Продуцент альбидопирона синтезирует также редкие соединения — феруленовую кислоту и фредерикамицин.

Обнаружен новый род актиномицетов *Micromonospora thermotolerans* SCSIO 00606, культура образует три новых производных γ -пирона — маринактиноны А-С. В положении 6 циклических частей молекул располагаются углеродные цепи различной длины и разветвленности (рис. 3). Соединения оказывают умеренное цитотоксическое действие на клетки нескольких линий, слабо ингибируют активность ДНК-топоизомеразы I [27].

Аналогичные результаты получены другими авторами при исследовании органических экстрактов из культуры *Nocardiosis* HB383, выделенной из морской губки. Производные γ -пирона у *Nocardiosis* обнаружены впервые [28].

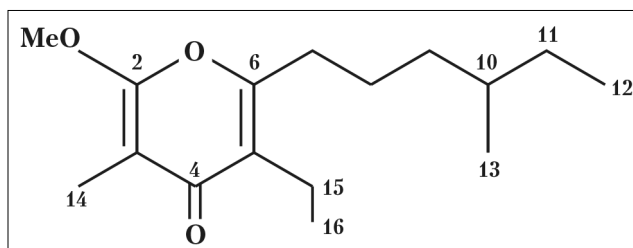


Рис. 3. Структура маринактинонов [27].

2.3. Производные пиридина

Структура пиридина представляет собой шестичленный ароматический цикл и отличается от бензола замещением одного из атомов углерода на атом трехвалентного азота. Среди вторичных метаболитов морских актиномицетов видное место занимают дипиридины — соединения, состоящие из двух остатков пиридина, связанных С-С связью, при этом возможно шесть изомеров структуры.

Морской актиномицет *Actinoalloteichus cyanogriseus* WHI-2216-6 синтезирует пять описанных впервые дипиридиновых соединений, обладающих свойствами алкалоидов и названных церуломицинами. Базовую структуру соединений составляют 2,2'-дипиридины. Компоненты различаются заместителями в одном из остатков пиридина (-ОН, -ОСН₃, -СОНН, -ОСН₃, -NH-ацил-С, =N-ОН). Все соединения показали токсичность в отношении ряда клеточных линий. Выделенный вместе с новыми соединениями ранее описанный компонент содержит в структуре оксимную группировку и является иммунодепрессором. Возникновение этой группировки объясняется действием двухкомпонентной монооксидазы на гидроксиламинную группу [29, 30].

Тот же продуцент в иных условиях культивирования образует четыре новых производных дипиридина, представляющих собой циклические гликозиды, возникающие в результате взаимодействия гидроксильных групп одного из остатков дипиридина с аномерным центром и соседним карбонилем кетосахара (цианогрисайды 1—4) [31].

Многочисленные антибиотики пиридины происходят из пренилированных полиоксипиридинов. Цитотоксичные пиридины С7 и С8 были первыми описанными представителями этого класса антибиотиков, синтезируемых морским стрептомицетом. У этих соединений две гидроксильные группы из трёх в остатке пиридина метилированы, боковая пренилирующая группа представляет 15-членную сопряженную углеродную цепь с эпоксидным элементом и изобутильной группой на конце цепи (рис. 4). С7 и С8 различаются количеством и расположением метильных групп и положением двойных связей [32].

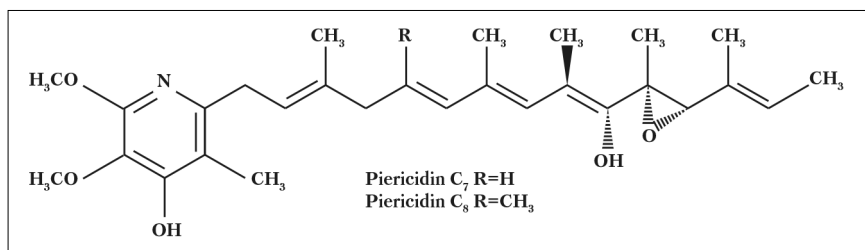


Рис. 4. Структура пиридицинов [32].

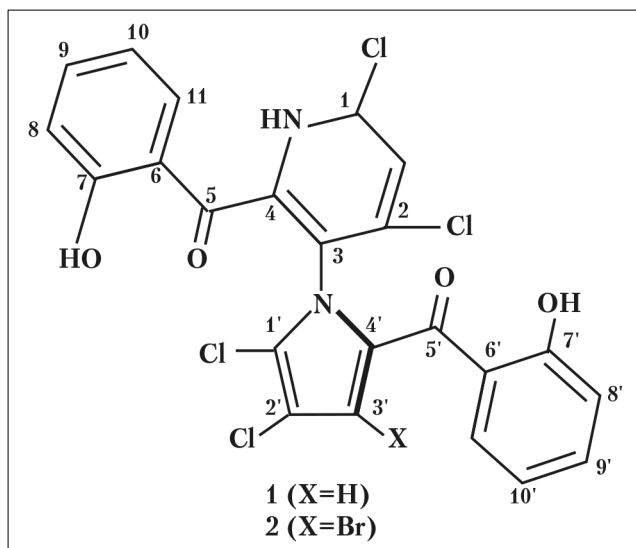


Рис. 5. Структура маринопиррола В [36].

Гликопиридицин С — гликозидное производное пиридицина С, образуется при культивировании морского стрептомицета. В основе метаболита лежит пренилированный полиоксипиридин, вещество обладает цитотоксической активностью [33].

2.4. Производные пиррола

Пиррол — пятичленный гетероцикл, в котором один атом углерода замещён на атом азота. Производные пиррола широко распространены в природе (алкалоиды, терпены, гемоглобин, хлорофилл). *Streptomyces* sp. СМВ-МО423, выделенный из пляжного песка острова Херон (Австралия), продуцирует фарнезирванные 2-нитропирролы — херонапирролы, являющиеся редкими членами пирролотерпенового класса. Фарнезильные группы в положении 4 гетероцикла состоят из остатков тетрагидрофурана. Соединения высокоактивны против грамположительных бактерий, но не цитотоксичны по отношению к клеточным линиям млекопитающих [34].

Пять новых фарнезирванных 2-нитропирролов (нитропирролины А—Е) были получены из культуры морского актиномицета CNQ-509, принадлежащего к группе «MAR4» морских актиномицетов, часто синтезирующих изопреновые вторичные метаболиты. Нитропирролины состоят из α -нитропирронов с фарнезильными группами в положении 4. Эти соединения являются первыми описанными природными терпенильными α -нит-

ропирролами. Нитропирролин D цитотоксичен в отношении НСТ клеток толстой кишки человека и обладает слабой активностью против метициллиноустойчивого золотистого стафилококка [35].

Облигатный штамм *Streptomyces* sp. CNQ-418 (близкий *Streptomyces sannorensis*), выделенный из морских отложений с

глубины 51 м вблизи La Jolla (Калифорния), при культивировании с морской водой при сильной аэрации синтезирует антибиотики маринопирролы А и В, проявляющие высокую активность против метициллиноустойчивых штаммов золотистого стафилококка [36]. Антибиотики имеют необычную структуру, основу которой составляют два дигаллоидопиррола, связанные друг с другом связью между N одного и C-3 другого. В структуре маринопиррола А два дихлорпиррола, в структуре маринопиррола В — один дихлорпиррол и один хлор-бромпиррол (рис. 5).

Рентгеноструктурный анализ показал, что при комнатной температуре антибиотик В находится в стабильном состоянии как атропо-энантиомер в М-конфигурации и рацемизируется при повышении температуры [36]. К сожалению, в присутствии сыворотки человека МПК маринопирролов увеличивается в 500 раз.

Используя структуру маринопирролов в качестве модели, химическим синтезом удалось получить несимметричные образцы продуктов, значительно превосходящие исходные маринопирролы по терапевтическому потенциалу [37]

2.4а. Карбазол- и индол-производные пиррола

Бензольные производные пиррола: карбазол-дибензопиррол и индол-бензопиррол.

Два новых индолокарбазола стрептокарбазолы А и В образуются морским стрептомицетом *Streptomyces* sp. FMA. Соединение А цитотоксично для HL-60 и клеточных линий А-549, может ингибировать клеточный цикл HeLa в определённой фазе. Структуры А и В установлены с помощью спектроскопических методов и квантово-механических расчётов. Два индольных атома азота индолокарбазольного ядра образуют циклические N-гликозидные связи с 1,3 атомами углерода гликозидного фрагмента (рис. 6) [38].

Мутантный штамм морского стрептомицета *Streptomyces fradiae* 007MI35 образует три новых индолокарбазола — фрадкарбазолы А—С, обладающие уникальным скелетом, состоящим из стауроспоринового кора, тиазольного цикла и индольного фрагмента. Все соединения имеют значительную цитотоксичность в отношении клеточных линий HL-60, K562, А-549, проявляют ингибиторный эффект в отношении поликетидсинтетазы [39].

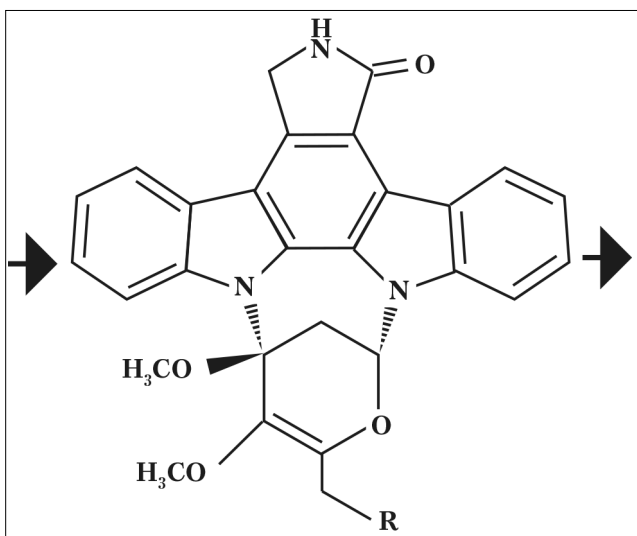


Рис. 6. Структура стрептокарбазола А [38].

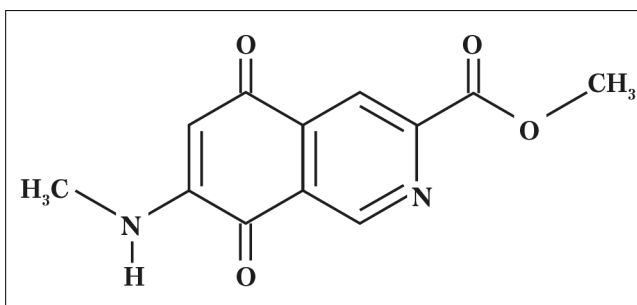


Рис. 7. Структура мансурамицина С [41].

Морской стрептомицет *Streptomyces* sp. DA-22 выделен из морской губки, обитающей в Южно-Корейском море. При культивировании микроорганизма при 28° и сильной аэрации наблюдается образование нового индольного производного — стрептомициндола вместе с ранее описанным родственным соединением N-фенил-ацетил-триптофаном. Структура метаболита установлена и подтверждена химическим синтезом. Вещество активно против грамположительных и грамотрицательных бактерий, ряда грибов [40].

2.5. Хиноны

Хиноны — соединения, имеющие строение циклических дикетонов, являются производны-

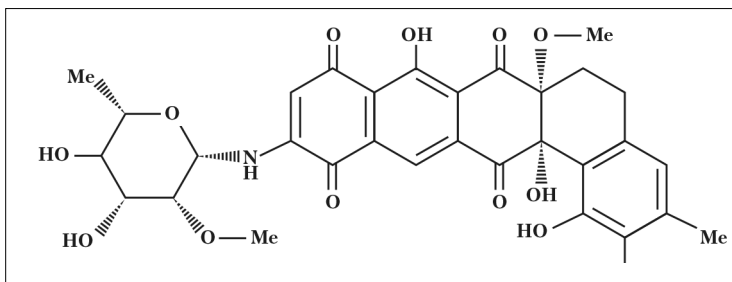


Рис. 8. Структура аренимицина [44].

ми дигидробензола. Они могут содержать кетогруппы в пара- и орто-положении.

Мансурамицины А-Д синтезируются морским стрептомицетом *Streptomyces* sp. Me137. Соединения имеют структуры изохинолинхинонов с замещающими группами в пиридиновом и в хинонном циклах (рис. 7). Цитотоксичность определялась в панели с 36 клеточными линиями. Значительная активность обнаружилась при действии на раковые клетки лёгких и других дыхательных органов, простаты [41, 42]. Осуществлен полный химический синтез мансурамицина D.

Штамм морского актиномицета *Saccaropolyspora taberi* PEM-06-F23-019В выделен из морской губки вблизи побережья Танзании. Гомогенизированная эктосома губки помещалась на агаризованную среду и инкубировалась при 28°. При ферментации выделенного штамма актиномицета получено новое цитотоксичное вещество ангуциклинон, идентифицированный как бенз- α -антрахинон, структура которого близка описанным ранее антрахинонам. Вещество цитотоксично для разного типа клеток карциномы человека [43].

Морской актиномицет *Salinispora arenicola* является продуцентом антибиотика аренимицина хиноидной структуры (рис. 8). Вещество активно против рифампино- и метициллиноустойчивых стафилококков, микобактерий, ингибирует деление эукариотических клеток путём неспецифического цитотоксического действия [44].

2.6. Поликетиды

Поликетиды — вторичные метаболиты микроорганизмов образуются действием поликетид-синтетаз на углерод-кислородные единицы, вызывая удлинение углеродных цепей, которые затем модифицируются под действием иных ферментных систем.

Как в случае нерибосомального пептидного синтеза, при синтезе поликетидов используется модульный принцип: для включения одной единицы в цепь требуется один модуль, который содержит все необходимые для этого активности [45].

Морской стрептомицет серии CNQ образует новые цитотоксические соединения поликетидного происхождения (дариамиды 1-3) и амид (2E,4E)-7-метилокта-2,4-диеновой кислоты, которая, вероятно, является предшественником дариамидов [46].

Стрептомицет *Streptomyces* sp. SCSIO 03032, выделенный из морских глубоководных отложений (Австралия), является продуцентом херонамидов D—F, циклических макролактамов поликетидного происхождения. Макролактамы различаются количеством, размером и строением циклических фрагментов. Возможно, что макролактамыный цикл замыкается за счёт длинноцепочечной непредельной аминокислоты. Херона-

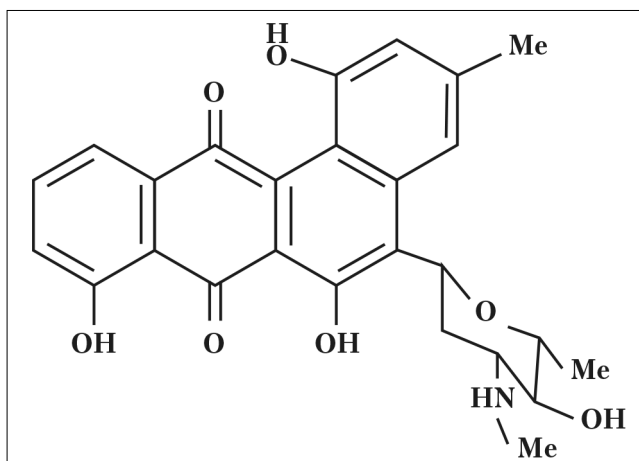


Рис. 9. Структура майямицина [49].

миды не обладают ни антибиотическими, ни цитотоксическими свойствами [47].

Непредельные макролактамы могут обладать биологической активностью, которую трудно обнаружить. Так, херонамид С и 8-дезоксид-херонамид С, образуемые морским стрептомицетом, действуют на насыщенные углеводородные цепи мембранных липидов микроорганизмов. Происходит скручивание, сшивание липидов, нарушаются структуры мембранных доменов, возникает аномальная морфология клеточных стенок [48].

Штамм морского стрептомицета *Streptomyces* sp. НВ 202, выделенный из морской губки, синтезирует новый метаболит майямицин, имеющий структуру бензантрацена (рис. 9). Вещество проявляет высокую токсичность против восьми линий раковых клеток человека и антимикробную активность, в том числе против штаммов, устойчивых к антибиотикам. Способность данного стрептомицета синтезировать ароматические поликетиды доказана генетическим анализом: показано наличие у микроорганизма поликетид-синтетазы типа II [49].

Абиссомицины G, H и C выделены из культуральной жидкости редкого морского актиномицета *Verrucospora* АВ 18-032, изолированного из образцов донных отложений Японского моря с глубины 289 м при скрининге ингибитора пути биосинтеза *n*-аминобензойной кислоты. Абиссомицин С является таким ингибитором, впервые обнаруженным у микроорганизмов. Кроме того, он проявляет сильное антибиотическое действие в отношении патогенных штаммов золотистого стафилококка с множественной устойчивостью. Абиссомицины — полициклические метаболиты поликетидного типа, их структуры подтверждены химическим синтезом [50].

Из солевой культуральной жидкости морского актиномицета выделено шесть противоопухолевых веществ со структурой нового класса — индоксамицины А—F, необычные поликетидные три-

циклические соединения, содержащие по шесть хиральных центров. Изучение механизма биосинтеза этих веществ с применением стабильных изотопов показало, что молекула индоксамицина собирается из пропионатных единиц. Варианты индоксамицинов различаются заместителями в основной части молекулы. Позднее вещества были получены химическим синтезом [51].

Акаеолид, новый полициклический поликетид, выделен из культуры морского стрептомицета. Метаболит представляет собой 15-членный карбоцикл, основа которого происходит из малонового цикла, тетрагидрофуранового цикла и β -кето- δ -лактона [52].

Анминденолы А и В из морского стрептомицета представляют собой сесквитерпеноиды, обладающие 5—6 циклами, образованными из изопренильных единиц. Вещества являются ингибиторами индущивельной синтазы окиси азота [53].

Моллемидин А, антималярийный и антибактериальный антибиотик, синтезируемый штаммом *Streptomyces* sp. СМВ 40244, выделенным из морских отложений в районе острова Молле (Австралия). Вещество является первым описанным представителем класса глико-гексадепсипептидо-поликетидов [54].

Гиалуромицин — новый член семейства антибиотиков рубромицинов, в его структуру входят кор γ -рубромицина и фрагмент 2-амино-3-гидроксид-циклопент-2-енон, являющийся амидным заместителем карбоксильной группы. Гиалуромицин в 25 раз более сильный ингибитор гиалуронидазы, чем глицирризин, известный ингибитор растительного происхождения [17].

Тартролон D — новый представитель серии тартролонов, синтезируется морским стрептомицетом *Streptomyces* sp. MDG 04 17 069. Метаболит имеет структуру циклического макродиолида, состоящую из двух идентичных частей, повернутых друг к другу на 180°. Тартролон D цитотоксичен в отношении трёх линий опухолевых клеток человека [55]. Морская бактерия *Teredinobacter turnerae* T7901, обитающая в жабрах корабельного червя, синтезирует тартролон E, направленный против пищевых конкурентов и патогенов организма-хозяина, а также образует целлюлолитические ферменты и способна фиксировать азот. Тартролон E имеет ту же структуру, что и тартролон D, но четыре внутрициклические ОН-группы связаны с одним атомом бора [56].

Девять компонентов неомаклафунгинов АI выделены из культуральной жидкости микроорганизма *Actinoalloteichus* NPS702, изолированного из морских отложений (Япония). Структуры метаболитов идентифицированы как 26-членные макролидные циклы, близкие по строению группе антибиотиков олигомицинов (рис. 10). В отличие от последних в качестве заместителей присут-

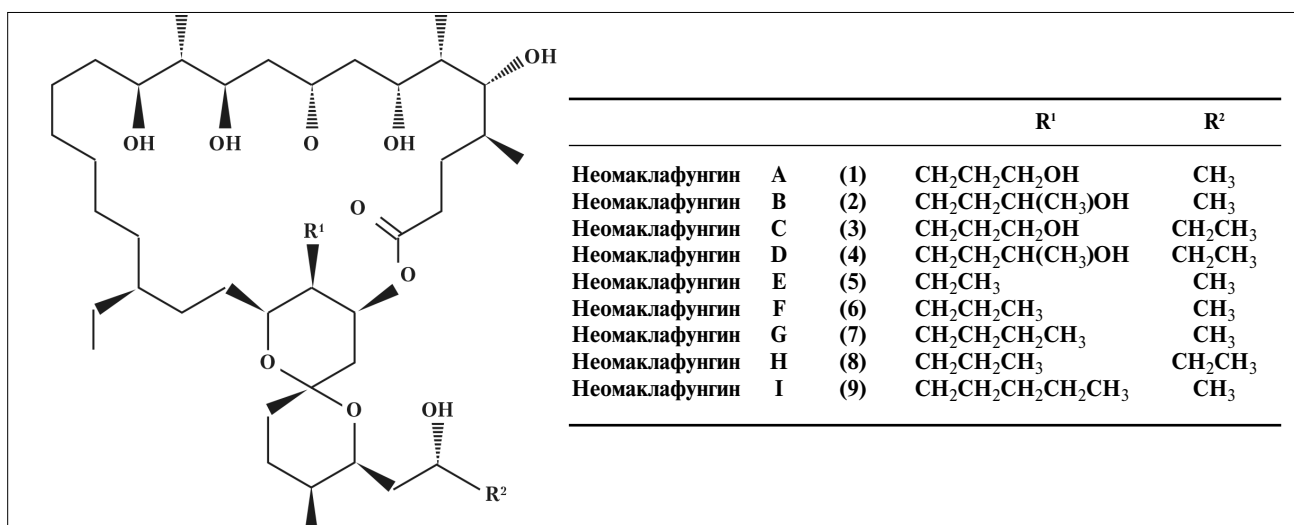


Рис. 10. Структура неомаклафунгинов [57].

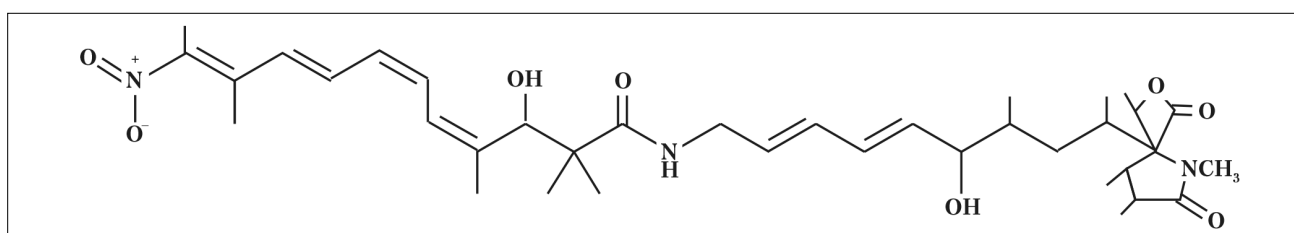


Рис. 11. Структура ладжолламицина [62].

ствуют алканы и алканоны, что и создает разнообразие неомаклафунгинов. Новые макролиды обладают антигрибной активностью, в частности, против *Trichophyton mentagrophytes* [57].

Новый 16-членный макролид бафиломицин L выделен из культуральной жидкости стрептомицета *Streptomyces* sp. OPMA00072. Метаболит ингибирует образование эфира холестерина в клетках животных. Одновременно синтезируется ранее известный бафиломицин CI, ингибитор синтеза эфира холестерина, структурно родственный новому ингибитору [58].

Бахамаолид А — новый макроциклический лактон, синтезируется морским стрептомицетом *Streptomyces* sp. CNQ343. Соединение является эффективным ингибитором изоцитратлиазы [59].

Лобофорины 1—5 получены при культивировании морского стрептомицета *Streptomyces* sp. 1053U.I.1a.3b, выделенного из образцов тканей микромоллюска *Lienardia totopotens* (Филиппины). Смесь образуемых лобофоринов содержит как новые, так и уже известные лобофорины — спиротетранатные поликетиды. Соединения 2—5 активны против *Mycobacterium tuberculosis* и, в зависимости от природы структурных заместителей, в разной степени против *B.subtilis* и *Proteus vulgaris* [60].

Лобофорины С и D получены при культивировании штамма *Streptomyces carnosus* AZS17, который выделен из морской губки из прибрежных

вод Восточно-Китайского моря. Лобофорин С обладает высокой цитотоксической активностью против клеток рака печени человека 7402. Лобофорин D эффективен против клеток рака молочной железы MDA-MB435. Химическая структура этих соединений установлена [61].

Streptomyces nodosus, выделенный из осадков каньона Ла Джолла в Калифорнии, является продуцентом антибиотика ладжолламицина, имеющего структуру нитро-тетраено-спиро-β-лактон-δ-лактама (рис. 11). Вещество активно против антибиотикоустойчивых грамположительных бактерий (МПК 1,5—2 мкг/мл) и ингибирует рост раковых клеток линии B16-F10 [62].

Новый полиеновый макролактан был получен из двух морских штаммов *Micromonospora* и обозначен как микромонолактан. Метаболит является структурным изомером салинилактама А, но содержит одну cis-двойную связь, в то время как у салинилактама все связи trans. Установлено, что микромонолактан представляет собой гибрид, состоящий из 11 поликетидных единиц, стартовой единицей является глутаминовая кислота, то есть биосинтез начинается нерибосомальная пептидсинтаза [63].

2.7. Полипептиды

Семейство новых аминофурановых антибиотиков проксимицинов А, В и С было выделено из культуральной жидкости морского штамма *Verrucosisspora* MG-37, изолированного из осадков

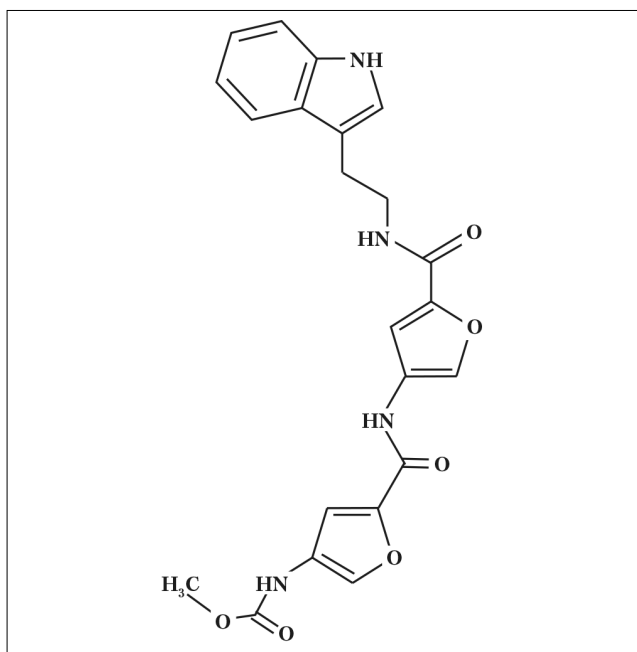


Рис. 12. Структура проксимицина С [64].

фиорда Раун (Норвегия) с глубины 250 м. Характерным структурным фрагментом проксимицинов является ранее неизвестная δ -аминокислота — 4-амино-фуран-2-карбоновая кислота. Проксимицины представляют собой линейные пептиды различной длины, образованные пептидными связями между молекулами фурановых кислот (рис. 12). Метаболиты малоактивны против микроорганизмов, но высокотоксичны в отношении клеток аденокарциномы желудка и гепатоклеточной карциномы, однако клетки дыхательной карциномы менее чувствительны [64].

Стрептомицет — продуцент ингибитора миграции раковых клеток ракицидина D выделен из вод Красного моря. Ингибитор представляет собой циклодеписипентапептид. Среди образующих его аминокислот одна содержит неопредельную связь, и одна — сложная аминокислота. Вещество препятствует продвижению раковой клетки в межклеточной жидкости [65].

Два новых циклогексапептида нокардиамиды А и В выделены из культуральной жидкости *Nocardiosis* sp. Циклопептиды образованы аминокислотами L-Tyr, D-Leu, D-Val, L-Val, D-Val, их структуры подтверждены твердофазным пептидным синтезом. Вещества А и В имеют незначительную антимикробную активность и не цитотоксичны в отношении НСТ-116 [66].

Урактапелстатин А, новый циклопептид, выделенный из мицелия актиномицета *Mechercharimyces asporophorigenens* YM 11-542 ингибирует рост клеток A_{549} рака лёгких человека (10_{50} — 12 нМ) и проявляет сильную цитотоксическую активность в отношении других раковых клеток человека [67].

Пять циклических октапептидов суругамидов 1—5 были получены при культивировании морского стрептомицета *Streptomyces* sp. J.AMM992. Структурной особенностью этих циклооктапептидов является то, что они состоят из 4 D-аминокислот и 4 L-аминокислот. Так, компонент 1 содержит по одному остатку D-Ala, D-Leu, D-Phe и D-Ile, а также три остатка L-Ile и один остаток L-lys [68].

2.8. Различные химические структуры

Streptomyces sp. NTK 937, выделенный из глубоководных донных осадков Канарской бухты, синтезирует антибиотик кабоксамицин, ингибирующий некоторые виды дрожжей, грамположительные бактерии, фитопатогены, но малоактивный против биоплёнок микроорганизмов. Кабоксамицины проявляют умеренную цитотоксичность против клеток карциномы желудка и карциномы молочной железы. Важнейшее значение имеет способность кабоксамицина ингибировать активность фосфодиэстераз, которые являются регуляторами различных физиологических функций. Так, ингибиторы фосфодиэстеразы-4 используются при терапии лёгочных заболеваний. Кабоксамицины имеют структуру бензоксазола, редкую у морских продуцентов, но распространённую у сухопутных стрептомицетов-продуцентов [69].

Усабамицины А-С синтезируются *Streptomyces* sp. NPS 853, выделенным из морских донных осадков. Вещества ингибируют рост клеток HeLa, подавляя захват ими серотонина — нейрогуморального регулятора и сосудосуживающего агента [70].

Нокатрионы А и В образуются штаммом *Nocardiosis* KMF002, выделенным из тканей морской губки. По структуре вещества представляют собой тетраценедионы с боковыми заместителями α -пироном, ОН- и кетогруппами. В клетках, обработанных веществом А, под действием ультрафиолета значительно снижается уровень белка ММ-1, разрушающего коллаген и другие внеклеточные соединения, из которых образуется кожная ткань [71].

Новое производное антрацена получено при культивировании *Streptomyces* sp. W007, выделенного из осадков бухты Каначоу. Структура вещества — 3-гидрокси-1-кето-3-метил-8-метокси-1,2,3-тетра-гидробензантрацен. Цитотоксичность соединения селективна в отношении клеточных линий и, возможно, по механизму цитотоксичности отличается от действия аналога этого вещества адриамицина. Вещество проявляет также антигрибную активность [72].

Новый β -гидроксил- δ -лактон неомакварицин обнаружен в экстракте культуры *Micromonospora* NPS2077, выделенной из неустановленной морской губки, собранной в заливе Ураночи (Япония) [73].

Морской стрептомицет *Streptomyces* sp. SCSIO 10428 образует три новых напиродиомицина (Н) наряду с шестью известными. Структура соеди-

нений: 4-дегидро-4а-дехлор-Н, 3-дехлор-3-бром-Н и 3-хлор-6,8-диокси-8-лапахон. Вещества обладают антибактериальной и цитотоксической активностью [74].

Новые ацилированные ариламиды получены из культуры морского стрептомицета. В скрининге использовали определённые клетки рака легкого NSC LC[15].

Диазахиномицины Е-Г изолированы из культуральной жидкости морского стрептомицета, взятого из коллекции морских микроорганизмов. В скрининге использовали клетки рака яичников, устойчивые к цис-платине. Получена смесь новых противоопухолевых диазахиномицинов и ранее описанный диазахиномицин А. Все соединения относятся к группе диазаантраценов [16].

Streptomyces sp. SCSIO, выделенный из осадков Южно-Китайского моря, синтезирует новый стероид прегнен 032190А, обладающий редко встречающейся двойной связью между атомами углерода 8 и 9. Химическая структура стероида близка структуре холестерина. Одновременно синтезируется нафтохиноновый антибиотик криптоспорин [75].

Дермакозины и стрептофеназины представляют собой дибензолные производные пиперазина, их разнообразие создается структурой заместителей в бензольных фрагментах молекулы.

При культивировании на сложных средах штаммов актиномицета *Dermacoccus abyssi* МТІ.1 и МТІ.2, выделенных из осадков Марианской впадины с глубины более 10000 м, образуются три новых дермакозина, обладающих антиоксидантными свойствами [76].

Стрептофеназины образуются при культивировании морского стрептомицета *Streptomyces* sp. Добавление в ферментационную среду некоторых антибиотиков в субингибиторных концентрациях приводит либо к увеличению биосинтеза основного продукта, либо к образованию новых компонентов того же класса. Таким способом были получены новые стрептофеназины С и Н, активные против *B.subtilis*. Компонент С активен против *Staphylococcus lentus* [77].

Химические структуры представленных выше активных метаболитов из морских актиномицетов установлены современными методами исследования, в основном спектрометрическими: ЯМР-масс-спектрометрия, комбинация различных спектрометрических методов, 1D- и 2D-ЯМР ((1)H-(1)H COSY, HSQC и HMBC) методы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rosenfeld W.D., ZoBell C.E. Antibiotic production by marine microorganisms. J Bacteriol 1947; 54: 3: 393—398.
2. Grein A., Meyers S.P. Growth characteristics and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and material suspended in seawater. J Bacteriol 1958; 76: 5: 457—463.
3. Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J Antibiot (Tokyo) 2009; 62: 1: 5—16.

Широко используются данные коллекций морских актиномицетов. Некоторые структуры подтверждены полным химическим синтезом, который осуществляется для поиска аналогов природных продуктов с оптимальными биологическими свойствами [70].

В табл. 1—3 приведены суммарные данные о характере биологической активности описанных выше вторичных метаболитов, синтезируемых морскими актиномицетами. В табл. 1 представлены метаболиты, обладающие антимикробной активностью, в табл. 2 — метаболиты с цитотоксической активностью, в табл. 3 — метаболиты, ингибирующие различные метаболитические процессы. Около 30% выделенных в 2007—2014 гг. морских актиномицетов, являющихся продуцентами вторичных метаболитов, синтезируют антимикробные вещества — антибиотики с той или иной степенью активности, при этом 40% из них активны против устойчивых патогенов.

Существенно важным является также высокое содержание среди выделенных культур продуцентов цитотоксичных метаболитов (мишени при скрининге — линии клеток рака человека) и ингибиторов метаболитических процессов: приблизительно по 30 % от общего количества выделенных продуцентов метаболитов. У ряда метаболитов выраженной биологической активности не обнаружено. Большинство морских актиномицетов-продуцентов составляют стрептомицеты, значительная часть которых не определена до вида.

Заключение

Представленный обзорный материал по вторичным метаболитам морских актиномицетов отражает большое разнообразие синтезируемых вторичных продуктов. Это могут быть новые не описанные ранее соединения (иногда целый класс аналогов) с уникальными химическими структурами и биологическими активностями. Часто образуются смеси соединений известного типа, возможно интересные по фармацевтическим свойствам. Иногда уникальность структур выражается в наличии в молекуле нескольких асимметрических центров. Биосинтез новых хемотипов биоактивных соединений морскими актиномицетами возможно является одним из проявлений химической адаптации микроорганизма к условиям обитания в море.

4. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. J Antibiot (Tokyo) 2012; 65: 8: 385—395.
5. Swathi J., Narendra K., Sowjanya K.M., Satya A.K. Marine fungal metabolites as a rich source of bioactive compounds. African J Biochem Res 2013; 7: 10: 184—196.
6. Walsh C.T., Wenciewicz T.A. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. J Antibiot (Tokyo) 2014; 67: 1: 7—22.
7. Stonic V.A. Marine natural products: a way to new drugs. Acta Naturae 2009; 1: 2: 15—25.

8. Thomas T.R., Kavlekar D.P., LocaBharathi P.A. Marine drugs from sponge-microbe association – a review. *Mar Drugs* 2010; 8: 4: 1417–1468.
9. Quévrain E., Roué M., Domart-Coulon I., Bourguet-Kondracki. Assessing the potential bacterial origin of the chemical diversity in calcareous sponges. *J Marine Sci Technol* 2014; 22: 1: 36–49.
10. Lin Z., Torres J.P., Ammon M.A. et al. A bacterial source for mollusk pyrone polyketides. *Chem Biol* 2013; 20: 1: 73–81.
11. www.fegi.ru/primorye/doctor,collec.htm
12. Subramani R., Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing of novel bioactive metabolites. *Microbiol Res* 2012; 167: 10: 571–580.
13. Liu H., Jiang H., Haltli B. et al. Rapid cloning and heterologous expression of the meridamycin biosynthetic gene cluster using a versatile *Escherichia coli-streptomyces* artificial chromosome vector, pSBAC. *J Nat Prod* 2009; 72: 3: 1245–1248.
14. O'Brien R.V., Davis R.W., Khosta C., Hillenmeyer M.E. Computational identification and analysis of orphan assembly-line polyketide synthases. *J Antibiot (Tokyo)* 2014; 67: 1: 89–97.
15. Fu P., Johnson M., Chen H. et al. Carpatamides A-C, cytotoxic arylamide derivatives from a marine-derived *Streptomyces* sp. *J Nat Prod* 2014; 77: 5: 1245–1248.
16. Mullooney M.W., Hainmhire E.O., Shaikh A. et al. Diazaquinomycins E-G, novel diaza-anthracene analogs from a marine-derived *Streptomyces* sp. *Mar Drugs* 2014; 12: 6: 3574–3586.
17. Harunari E., Imada C., Igarashi Y. et al. Hyaluronycin, a new hyaluronidase inhibitor of polyketide origin from a marine *Streptomyces* sp. *Mar Drugs* 2014; 12: 1: 491–507.
18. Berrue F., Withers S.T., Haltli B. et al. Chemical screening method for the rapid identification of microbial sources of marine invertebrate-associated metabolites. *Mar Drugs* 2011; 9: 3: 369–381.
19. Imhoff J.F., Labes A., Wiese J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnol Adv* 2011; 29: 5: 468–482.
20. Соболевская М.П., Кузнецова Т.А. Биоактивные соединения морских актиномицетов. *Биоорг химия* 2010; 36: 5: 607–621. / Sobolevskaja M.P., Kuznecova T.A. Bioaktivnye soedinenija morskikh aktinomictov. *Biorg himija* 2010; 36: 5: 607–621. [in Russian]
21. Raiu R., Piggott A.M., Huang X.C., Capon R.J. Nocardioazines: a novel bridged diketopiperazine scaffold from a marine-derived bacterium inhibits P-glycoprotein. *Org Lett* 2011; 13: 10: 2770–2773.
22. Fu P., Liu P., Qu H. et al. α -Pyrone and diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Nocardiopsis dassonvillei* HR10-5. *J Nat Prod* 2011; 74: 10: 2219–2223.
23. Raiu R., Piggott A.M., Conte M. et al. Naseseazines A and B: a new dimeric diketopiperazine framework from a marine-derived actinomycete, *Streptomyces* sp. *Org Lett* 2009; 11: 17: 3862–3865.
24. Wang P., Xi L., Liu P. Diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. FXJ7.328. *Mar Drugs* 2013; 11: 4: 1035–1049.
25. Zhang J., Jiang Y., Cao Y. et al. Violapyrones A-G, α -pyrone derivatives from *Streptomyces violascens* isolated from *Hylobates hoolock* feces. *J Nat Prod* 2013; 76: 11: 2126–2130.
26. Hohmann C., Schneider K., Bruntner C. et al. Albidopyrone, a new alpha-pyrone-containing metabolite from a marine-derived *Streptomyces* sp. NTK 227. *J Antibiot (Tokyo)* 2009; 62: 2: 75–79.
27. Wang F., Tian X., Huang C. et al. Marinactinones A-C, new γ -pyrones from marine actinomycete *Marinactinospira thermotolerans* SCISIO 00606. *J Antibiot* 2011; 64: 2: 189–192.
28. Schneemann I., Ohlendorf B., Zinecker H. et al. Nocapyrones A-D, gamma-pyrone derivatives from a *Nocardiopsis* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panacea*. *J Nat Prod* 2010; 73: 8: 1444–1447.
29. Fu P., Wang S., Hong K. et al. Cytotoxic bipyridines from the marine-derived actinomycete *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. *J Nat Prod* 2011; 74: 8: 1751–1756.
30. Zhu Y., Zhang Q., Li S. et al. Insights into caerulomycin A biosynthesis: a two-component monooxygenase CrmH-catalyzed oxime formation. *J Am Chem Soc* 2013; 135: 50: 18750–18753.
31. Fu P., Liu P., Li X. et al. Cyclic bipyridine glycosides from the marine-derived actinomycete *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. *Org Lett* 2011; 13: 22: 5948–5951.
32. Hayakawa Y., Shirasaki S., Kawasaki T. et al. Structures of new cytotoxic antibiotics, piericidins C7 and C8. *J Antibiot (Tokyo)* 2007; 60: 3: 201–203.
33. Shaaban K.A., Helmke E., Kelter J. et al. Glucopiericidin C: a cytotoxic piericidin glucoside antibiotic produced by marine *Streptomyces* isolate. *J Antibiot (Tokyo)* 2011; 64: 2: 205–209.
34. Raiu R., Piggott A.M., Barrientos Diaz L.X. et al. Heronapyrroles A-C: farnesylated 2-nitropyrroles from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. *Org Lett* 2010; 12: 22: 5158–5161.
35. Kwon H.C., Espindola A.P., Park J.S. et al. Nitropyrrolins A-E, cytotoxic farnesyl- α -nitropyrroles from marine-derived bacterium within the actinomycete family *Streptomycetaceae*. *J Nat Prod* 2010; 73: 12: 2047–2052.
36. Hughes C.C., Prieto-Davo A., Jensen P.R., Fenical W. The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. *Org Lett* 2008; 10: 4: 629–631.
37. Liu Y., Haste N.M., Thienphrapa W. et al. Marinopyrrole derivatives as potential antibiotic agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mar Drugs* 2012; 10: 4: 953–962.
38. Fu P., Yang C., Wang Y. et al. Streptocarbazoles A and B, two novel indolocarbazoles from the marine-derived actinomycete strain *Streptomyces* sp. FMA. *Org Lett* 2012; 14: 9: 2422–2425.
39. Fu P., Zhuang Y., Wang Y. et al. New indocarbazoles from a mutant strain of the marine-derived actinomycete *Streptomyces fradiae* 007M135. *Org Lett* 2012; 14: 24: 6194–6197.
40. Huang X.-L., Gao Y., Xue D.-Q. et al. Streptomycindole, an indole alkaloid from a marine *Streptomyces* sp. DA22 associated with South China Sea sponge *Craniella australiensis*. *Helv Chim Acta* 2011; 94: 10: 1838–1842.
41. Hawas U.W., Shaaban M., Shaaban K.A. et al. Mansouramycins A-D, cytotoxic isoquinolinequinones from a marine streptomyces. *J Nat Prod* 2009; 72: 12: 2120–2124.
42. Prakash K.S., Nagarajan R. Total synthesis of the marine alkaloid mansouramycin D. *Org Lett* 2014; 16: 1: 244–246.
43. Pérez M., Schleissner C., Rodríguez P. et al. PMO70747, a new cytotoxic angucyclinone from the marine-derived *Saccharopolyspora taberi* PEM-06-F23-019B. *J Antibiot (Tokyo)* 2009; 62: 3: 167–169.
44. Asolkar R.N., Kirkland T.N., Jensen P.R., Fenical W. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Antibiot (Tokyo)* 2010; 63: 1: 37–39.
45. Орлова Т.И., Булгакова В.Г., Полин А.Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. III. Механизм биосинтеза нерибосомальных пептидов. *Антибиотики и химиотерапия* 2012; 57: 7–8: 43–54. / Orlova T.I., Bulgakova V.G., Polin A.N. Biologicheski aktivnye neribosomal'nye peptidy. III. Mehanizm biosintetza neribosomal'nyh peptidov. *Antibiotiki i himioter* 2012; 57: 7–8: 43–54 [in Russian]
46. Asolkar R.N., Jensen P.R., Kauffman C.A., Fenical W. Daryamides A-C, weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085. *J Nat Prod* 2006; 69: 12: 1756–1759.
47. Zhang W., Li S., Zhu Y. et al. Heronamides D-F, polyketide macrolactams from the deep-sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 03032. *J Nat Prod* 2014; 77: 2: 388–391.
48. Sugiyama R., Nishimura S., Matsumori N. et al. Structure and biological activity of 8-deoxyheronamide C from a marine-derived *Streptomyces* sp.: heronamides target saturated hydrocarbon chains in lipid membranes. *J Am Chem Soc* 2014; 136: 14: 5209–5212.
49. Schneemann I., Kajahn I., Ohlendorf B. et al. Mayamycin, a cytotoxic polyketide from a *Streptomyces* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. *J Nat Prod* 2010; 73: 7: 1309–1312.
50. Keller S., Nicholson G., Drahl C. et al. Abyssomycins G and H and atrop-abyssomycin C from the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *J Antibiot (Tokyo)* 2007; 60: 6: 391–394.
51. Sato S., Iwata F., Mukai T. et al. Indoxamycins A-F, cytotoxic tricyclic polypropionates from a marine-derived actinomycete. *J Org Chem* 2009; 74: 15: 5502–5509.
52. Igarashi Y., Zhou T., Sato S. et al. Akaeolide, a carbocyclic polyketide from marine-derived *Streptomyces*. *Org Lett* 2013; 15: 22: 5678–5681.
53. Lee J., Kim H., Lee T.G. et al. Anminderols A and B, inducible nitric oxide synthase inhibitors from a marine-derived *Streptomyces* sp. *J Nat Prod* 2014; 77: 6: 1528–1531.
54. Raiu R., Khalil Z.G., Piggott A.M. et al. Mollemycin A: an antimalarial glycohexadepsipeptide-polyketide from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. (CMB-MO244). *Org Lett* 2014; 16: 6: 1716–1719.
55. Pérez M., Crespo C., Schleissner C. et al. Tartrolon D, a cytotoxic macrodiolide from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. MDG-04-17-069. *J Nat Prod* 2009; 72: 12: 2192–2194.
56. Elshahawi S.I., Trindade-Silva A.E., Hanora A. et al. Boronated tartrolon antibiotic produced by symbiotic cellulose-degrading bacteria in shipworm gills. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 4: E295–304.
57. Sato S., Iwata F., Yamada S., Katayama M. Neomaclafungins A-I: oligomycin-class macrolides from a marine-derived actinomycete. *J Nat Prod* 2012; 75: 11: 1974–1982.
58. Kobayashi K., Fukuda T., Usui T. Bafilomycin L, a new inhibitor of cholesterol ester synthesis in mammalian cells, produced by marine-derived *Streptomyces* sp. OPMA00072. *J Antibiot (Tokyo)* 2015; 68: 2: 126–132.
59. Lee S.H., Moon K., Kim H. et al. Bahamaolide A from the marine-derived *Streptomyces* sp. CNQ343 inhibits isocitrate lyase in *Candida albicans*. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24: 17: 4291–4293.

60. Lin Z., Koch M., Pond C.D. et al. Structure and activity of lobophorins from a turrid mollusk-associated *Streptomyces* sp. J Antibiot (Tokyo) 2014; 67: 1: 121–126.
61. Wei R.B., Xi T., Li J. et al. Lobophorins C and D, new kijanimycin derivatives from a marine sponge-associated actinomycetal strain AZS17. Mar Drugs 2011; 9: 3: 359–368.
62. Ko K., Lee S.H., Kim S.H. et al. Lajollamycins, nitrogroup-bearing spiro- β -lactone- γ -lactams obtained from a marine-derived *Streptomyces* sp. J Nat Prod 2014; 77: 9: 2099–2104.
63. Skellam E.J., Stewart A.K., Strangman W.K., Wright J.L. Identification of micromonolactam, a new polyene macrocyclic lactam from two marine *Micromonospora* strains using chemical and molecular methods: clarification of the biosynthetic pathway from a glutamate starter unit. J Antibiot (Tokyo) 2013; 66: 7: 431–441.
64. Fiedler H.P., Bruntner C., Riedlinger J. et al. Proximycins A, D and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosipora*. J Antibiot (Tokyo) 2008; 61: 3: 158–163.
65. Igarashi Y., Shimasaki R., Miyana S. et al. Rakicidin D, an inhibitor of tumor cell invasion from marine-derived *Streptomyces* sp. J Antibiot (Tokyo) 2010; 63: 9: 563–565.
66. Wu Z.C., Li S., Nam S.J. et al. Nocardioides A and B, two cyclohexapeptides from the marine-derived actinomycete *Nocardiopsis* sp.CNX037. J Nat Prod 2013; 76: 4: 694–701.
67. Matsuo Y., Kahon K., Yamori T. et al. Urukthapelstatin A, a novel cytotoxic substance from marine-derived *Mechercharimyces asporophorigens* YM11-542. I. Fermentation, isolation and biological activities. J Antibiot (Tokyo) 2007; 60: 4: 251–255.
68. Takada K., Ninomiya A., Naruse M. et al. Surugamides A-E, cyclic octapeptides with four D-amino acid residues, from a marine *Streptomyces* sp.: LC-MS-aided inspection of partial hydrolysates for the distinction of D- and L-amino acid residues in the sequence. J Org Chem 2013; 78: 13: 6746–6750.
69. Hohmann C., Schneider K., Bruntner C. et al. Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. J Antibiot (Tokyo) 2009; 62: 2: 99–104.
70. Sato S., Iwata F., Yamada S. et al. Usabamycins A-C: new anthramycin-type analogues from a marine-derived actinomycete. Bioorg Med Chem Lett 2011; 21: 23: 7099–7101.71.
71. Kim M.C., Hwang E., Kim T. et al. Nocatriones A and B, photoprotective tetracenediones from a marine-derived *Nocardiopsis* sp. J Nat Prod 2014; 77: 10: 2326–2330.
72. Zhang H., Wang H., Cui H. et al. A new anthracene derivative from marine *Streptomyces* sp.W007 exhibiting highly and selectively cytotoxic activities. Mar Drug 2011; 9: 9: 1502–1509.
73. Sato S., Iwata F., Fukae T., Katayama M. Neomacquarimicin: a new macquarimicin analog from marine-derived actinomycete. J Antibiot (Tokyo) 2014; 67: 6: 479–482.
74. Wu Z., Li S., Chen Y. et al. Antibacterial and cytotoxic new napyradiomycins from the marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 10428. Mar Drugs 2013; 11: 6: 2113–2125.
75. Zhang Y., Zhou X., Huang H. et al. 03219A, a new D(8,9)-pregnene isolated from *Streptomyces* sp. SCSIO 03219 obtained from a South China Sea sediment. J Antibiot (Tokyo) 2013; 66: 6: 327–331.
76. Wagner M., Abdel-Mageed W.M., Ebel R. et al. Dermacozines H-J isolated from a deep-sea strain of *Dermacoccus abyssi* from Mariana Trench sediments. J Nat Prod 2014; 77: 2: 416–420.
77. Mitova M.I., Lang G., Wiese J., Imhoff J.F. Subinhibitory concentrations of antibiotics induce phenazine production in a marine *Streptomyces* sp. J Nat Prod 2008; 71: 5: 824–827.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Орлова Тамара Ивановна — д.м.н., старший научный сотр., должность — ст. научный сотрудник, кафедра микробиологии биологического факультета МГУ

Булгакова Вера Георгиевна — к.б.н., старший научный сотрудник, должность — ст. научный сотрудник, кафедра микробиологии биологического факультета МГУ.

Полин Анатолий Николаевич — д.б.н., профессор, должность — ведущий научный сотрудник, кафедра микробиологии биологического факультета МГУ

**ПОИСК И РАЗРАБОТКА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ:
БИЗНЕС ПРЕЖДЕ ВСЕГО?**

**ANTIBIOTIC RESEARCH AND DEVELOPMENT:
BUSINESS AS USUAL? / S. HARBARTH*,
U. THEURETZBACHER, J. HACKETT, ON BEHALF
OF THE DRIVE-AB CONSORTIUM // JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015;
70: 6: 1604–1607.**

Глобальный груз антибиотикоустойчивости при отсутствии новых противоинфекционных стратегий в последующие десятилетия будет только нарастать. Несмотря на увеличивающуюся потребность в новых антибиотиках, в настоящее время некоторые фармацевтические компании сдерживают программы по активному поиску новых антибактериальных лекарств. Одна из причин этого заключается в проблематичности, с научной точки зрения, открытия новых антибиотиков, активных в отношении антибиотикоустойчивых бактерий, представляющих клинический интерес в настоящее время. Однако основным затруднением является снижение побудительной экономической мотивации. Всё увеличивающиеся повсеместные призывы снизить избыточное применение антибиотиков, издержки на выполнение соответствующих требований по его регулированию и низкие цены на антибиотики на современном рынке сильно затрудняют разработку программ по антибактериальным лекарствам. Новые экономические модели, мотивирующие открытие новых антибиотиков и соответствующие требованиям ответственного назначения антибиотиков, сильно запоздали. Частно-общественный консорциум DRIVE-AB с капиталом в 9,4 млн евро, финансируемый при содействии «Инициативы инновационных лекарственных средств» при Европейском Союзе (EU Innovative Medicines Initiative), ставит своей целью определить стандарт ответственного применения антибиотиков, а также разработать, протестировать и рекомендовать новые экономические модели привлечения инвестиций в производство новых противоинфекционных средств.

* Infection Control Program and Division of Infectious Diseases, University of Geneva Hospitals and Medical Faculty, Geneva, Switzerland.

**ЭВОЛЮЦИЯ И ДИССЕМИНАЦИЯ ОQХАВ-ПОДОБНЫХ
ПОМПОВЫХ НАСОСОВ — ПОЯВЛЯЮЩИХСЯ
ДЕТЕРМИНАНТ УСТОЙЧИВОСТИ К ХИНОЛОНАМ
СРЕДИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ENTEROBACTERIACEAE.**

**EVOLUTION AND DISSEMINATION OF OQXAB-LIKE
EFFLUX PUMPS, AN EMERGING QUINOLONE**

**RESISTANCE DETERMINANT AMONG MEMBERS
OF ENTEROBACTERIACEAE / M. HO YIN WONG,
E. WAI CHI CHAN, S. CHEN* // ANTIMICROBIAL
AGENTS CHEMOTHERAPY 2015; 59: 6: 3290–3297.**

В последнее десятилетие преобладающим механизмом устойчивости к хинолонам, опосредованным плазмидой, у представителей Enterobacteriaceae является помповый насос OqxAB. Для исследования эволюции и путей диссеминации *oqxAB* оперона оценивали распространение *oqxAB*-подобных элементов среди различных видов грамотрицательных бактерий и анализировали гено- и фенотипические характеристики содержащих их микроорганизмов. При полном генотипическом анализе хромосомный *oqxAB* оперон был обнаружен у всех проверенных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных до 1984 г. Филогенетическим и сиквенс анализом было подтверждено, что *oqxAB* оперон штаммов *Klebsiella pneumoniae* генетически наиболее близок к плазмидным двойникам, выделенным только в штаммах *Escherichia coli* и *Salmonella* начиная с 2003 г. и позднее. Хромосомальные элементы с более низкой гомологией последовательности были найдены также у *Enterobacter* spp., но не у других грамотрицательных видов. В отличие от фенотипа устойчивости, наблюдаемого у микроорганизмов с *oqxAB*-содержащими плазмидами, хромосомальные *oqxAB* элементы обычно не обеспечивают устойчивость к хинолонам, за исключением штаммов *K. pneumoniae* с типичным *oqxAB* фенотипом, характеризующимся перекрёстной устойчивостью к олаквиндоксу, хлорамфениколу и хинолонам. Анализ геной экспрессии показал, что такие фенотипы обусловлены возросшей экспрессией хромосомального *oqxAB* оперона. Более того, перемещение *oqxAB* оперона из бактериальной хромосомы на плазмиды приводило к более чем 80-кратному увеличению экспрессии OqxAB насоса, подтверждая его статус первой конститутивно экспрессируемой системы выброса, локализованной на бактериальных мобильных элементах.

*Shenzhen Key Laboratory for Food Biological Safety Control, Food Safety and Technology Research Centre, Hong Kong PolyU Shenzhen Research Institute, Shenzhen, People's Republic of China.

* State Key Laboratory of Chirosciences, Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, Kowloon, Hong Kong.

**ПОЯВЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ШИРОКОГО СПЕКТРА
У PSEUDOMONAS AERUGINOSA И ACINETOBACTER
BAUMANNII: МЕХАНИЗМЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИЯ.
ОБЗОР.**

EMERGING BROAD-SPECTRUM RESISTANCE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *ACINETOBACTER BAUMANNII*: MECHANISMS AND EPIDEMIOLOGY / A. POTRON, L. POIREL*, P. NORDMANN // IJAA 2015; 45: 6: 568—585.

Мультилекарственная устойчивость — обычное явление среди неферментирующих грамотрицательных (ГО) бактерий, особенно клинически важных видов, включая *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. Эти виды бактерий, являющиеся, главным образом, внутрибольничными патогенами, обладают разнообразными механизмами устойчивости, приводящими к множественной и даже полной устойчивости. Основное внимание обзора сосредоточено на бета-лактамазах расширенного спектра, обеспечивающих устойчивость к цефалоспорином широкого спектра действия, карбапенемам, детерминантам устойчивости к карбапенемам, 16S рРНК метилазам, определяющих устойчивость ко всем клинически релевантным аминогликозидам. Сопутствующая устойчивость к фторхинолонам, полимиксинам (колистину) и тигециклину может привести к полной, панлекарственной устойчивости. В обзоре детально рассматриваются самые важные механизмы устойчивости *P.aeruginosa* и *A.baumannii* и главные пути их глобальной диссеминации.

* Medical and Molecular Microbiology Unit, Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg, rue Albert Gockel 3, CH-1700 Fribourg, Switzerland.

КИБДЕЛОМИЦИН — АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ ШИРОКОГО БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ В ОТНОШЕНИИ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ.

KIBDELOMYCIN IS A BACTERICIDAL BROAD-SPECTRUM AEROBIC ANTIBACTERIAL AGENT / S. B. SINGH*, P. DAYANANTH, C. J. BALIBAR, C. GARLISI, J. LU, R. KISHII, M. TAKEI, Y. FUKUDA, S. HA, K. YOUNG // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2015; 59: 6: 3474—3481.

Устойчивость бактерий к антибиотикам продолжает расти и порождает серьёзные проблемы, тогда как открытие новых антибиотиков снижается. Недавно описан новый природный антибиотик кибделомицин, подавляющий рост бактерий за счёт ингибирования ферментов репликации ДНК бактерий: ДНК гиразы и топоизомеразы IV. Обладая широким спектром действия в отношении грамположительных (ГП) аэробов, кибделомицин избирательно подавляет анаэробную *Clostridium difficile*. Определён спектр действия кибделомицина на более чем 196 штаммах ГП и

граммотрицательных (ГО) аэробных патогенных бактерий, выделенных в популяциях больных в разных частях света. Были определены значения МПК₅₀, МПК₉₀ и бактерицидная активность кибделомицина и подтверждён широкий спектр активности в отношении ГП бактерий, а также впервые была показана высокая активность (МПК₉₀, 0,125 мкг/мл) в отношении ГО анаэробного неферментирующего *Acinetobacter baumannii* и слабая активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Было установлено, что хорошо изученные устойчивые штаммы *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* не обладали перекрёстной устойчивостью к кибделомицину, хинолонам и кумариновым антибиотикам. Кибделомицин не является субстратом помпового выброса у *Pseudomonas* в отличие от *Escherichia coli*. Обычно на его действие влияет барьер проницаемости наружной мембраны у неферментирующих *P.aeruginosa* и *A.baumannii*, но он может быть преодолен за счёт структурной химической модификации.

*Merck Research Laboratories, Kenilworth, New Jersey, USA.

АКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ ЦЕФТАЗИДИМ-АВИБАКТАМ В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ К ФТОРХИНОЛОНАМ ШТАММОВ ENTEROBACTERIACEAE И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

ACTIVITY OF CEFTAZIDIME-AVIBACTAM AGAINST FLUOROQUINOLONE-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* / C. PITART, F. MARCO, T. A. KEATING, W. W. NICHOLS, J.VILA* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2015; 59: 6: 3059—3065.

Методом микроразведений в бульоне была протестирована активность комбинации цефтазидим-авибактам (Ц-А) и антибиотиков сравнения в отношении 200 штаммов Enterobacteriaceae и 25 штаммов выделенные в данном учреждении *Pseudomonas aeruginosa*, включая относящиеся к фенотипу с бета-лактамазами расширенного спектра (БЛРС) и устойчивые к цефтазидиму. Также были определены значения МПК и механизмы устойчивости к фторхинолонам. Комбинация Ц-А подавляла 99% фторхинолоноустойчивых (ФУ) штаммов Enterobacteriaceae при МПК ≤4 мг/л (при использовании пограничных значений чувствительности одного цефтазидима как стандарта по CLSI), была высокоактивна в отношении БЛРС-продуцирующих штаммов *Escherichia coli* (МПК₉₀ 0,25 мг/л) и *Klebsiella pneumoniae* (МПК₉₀ 0,5 мг/л); устойчивых к цефтазидиму (МПК₉₀ 1 мг/л) AmpC-продуцирующих видов; не образу-

ющих БЛРС штаммов *E.coli* (МПК₉₀ ≤0.125 мг/л) и *K.pneumoniae* (МПК₉₀ 0,25 мг/л), а также не устойчивых к цефтазидиму AmpC-продуцирующих видов (МПК₉₀ ≤0,5 мг/л). МПК Ц-А для 96% ФУ штаммов *P.aeruginosa* (при использовании пограничных значений одного цефтазида как стандарта CLSI) составила ≤8 мг/л при МПК₉₀ 8 мг/л. У каждого из испытанных видов бактерий были получены *in vitro* ФУ мутанты: одни из чувствительного к цефтазидиму штамма, другие из штамма-продуцента бета-лактамазы с высоким значением МПК цефтазида, но чувствительного к Ц-А. Таким образом, было оценено влияние устойчивости к фторхинолонам на активность Ц-А. Значения МПК₉₀ Ц-А для ФУ мутантных штаммов Enterobacteriaceae и *P.aeruginosa* были равны ≤4 мг/л и ≤8 мг/л соответственно. Авторы заключают, что наличие устойчивости к фторхинолонам не влияет на чувствительность энтеробактерий и *P.aeruginosa* к Ц-А, т.е. отсутствует перекрёстная устойчивость.

* Т. А. Keating, ImmunoGen, Inc., Biochemistry Department, Waltham, Massachusetts, USA.

IN VITRO ФАРМАКОДИНАМИКА КОМБИНАЦИЙ РАЗЛИЧНЫХ АНТИБИОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ KLEBSIELLA PNEUMONIAE С ЭКСТЕНСИВНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ.

IN VITRO PHARMACODYNAMICS OF VARIOUS ANTIBIOTICS IN COMBINATION AGAINST EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT KLEBSIELLA PNEUMONIAE / T.-P. LIM, Y. CAI, Y. HONG, E. C. Y. CHAN, S. SURANTHRAN, J. Q.-M. TEO, W. H. LEE, T.-Y. TAN, L.-Y. HSU, T.-H. KOH, T.-T. TAN, A. L.-H. KWA* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2015; 59: 5: 2515–2524.

В Сингапуре был выделен штамм *Klebsiella pneumoniae* с экстенсивной лекарственной устойчивостью (XDR). При ограниченном терапевтическом выборе только комбинация антибиотиков могла быть эффективна в отношении штаммов *K.pneumoniae* с XDR, что и явилось целью исследования. Шесть (6) NDM-1-продуцирующих штаммов и 2 ОХА-181- продуцирующих штамма *K.pneumoniae* подвергались воздействию 12 антибиотиков как в отдельности, так и их комбинаций в формате «time-kill» исследования. Для воспроизведения действия клинически релевантных режимов дозирования тигециклина+меропенема на двух XDR-штаммах *K.pneumoniae* в течение 240 ч использовали модель инфекции на диализных мембранах (HFIM) с определёнными фармакокинетическими показателями. Появление устойчивости к тигециклину количественно определяли на среде,

свободной от антибиотика и содержащей 3×МПК тигециклина (селективная среда). Скорость роста *in vitro* и появление устойчивых штаммов на 240 ч определяли с помощью серийных посевов на обычной и селективной средах. Значения МПК полимиксина В и тигециклина были в пределах 1–4 мг/л. В одновременных для всех антибиотиков исследованиях «time-kill» в случае всех отдельно взятых антибиотиков на 24 час. наблюдали вторичный рост, за исключением полимиксина В в отношении двух штаммов. Комбинация тигециклин+меропенем была бактерицидной для 50% штаммов. На штаммы, продуцирующие ОХА-181-подобные карбапенемазы, ни одна из 55 испытанных комбинаций антибиотиков не оказывала бактерицидного действия. На HFIM модели только у 2 штаммов снижение бактериальной нагрузки в течение 96 ч под действием комбинации тигециклин+меропенем достигало >90% до начала вторичного роста, на 240 ч составляющего 10⁹ КОЕ/мл. Фенотипически стабильные резистентные штаммы, выделенные после HFIM- исследований на чашках с тигециклином, обладали более низкой скоростью роста по сравнению с соответствующими родительскими штаммами из-за существенного дефицита фитнеса. Итак, было установлено, что комбинация тигециклин+меропенем может быть очень активной при XDR- *K.pneumoniae* инфекции, но эффективность специфична для каждого штамма.

* Department of Pharmacy, Singapore General Hospital, Singapore, Emerging Infectious Diseases, Duke-NUS Graduate Medical School, Singapore.

ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ ТРАНСКРИПТОМА ACINETOBACTER BAUMANNII НА ДЕЙСТВИЕ КОЛИСТИНА И ДОРИПЕНЕМА ПО ОТДЕЛЬНОСТИ И В КОМБИНАЦИИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЙ/ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ.

THE TRANSCRIPTOMIC RESPONSE OF ACINETOBACTER BAUMANNII TO COLISTIN AND DORIPENEM ALONE AND IN COMBINATION IN AN IN VITRO PHARMACOKINETICS/PHARMACODYNAMICS MODEL / R.HENRY*, B. CRANE, D. POWELL, D. DEVESON LUCAS, Z. LI, J. ARANDA, P. HARRISON, R. L. NATION, B. ADLER, M. HARPER, J. D. BOYCE, J. LI // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 5: 1303–1313.

Колистин остаётся последним средством лечения инфекций, обусловленных *Acinetobacter baumannii* с мультилекарственной устойчивостью (MDR), а комбинация его с карбапенемами, как было показано, оказывает синергидный эффект на MDR

штаммы. Для понимания механизма отклика бактерий на указанные антибиотики был проанализирован транскриптом *A.baumannii* после экспозиции с каждым антибиотиком. Для определения изменений транскриптома после воздействия колистином и дорипенемом как по отдельности, так и их комбинацией на фармакокинетической/фармакодинамической (ФК/ФД) *in vitro* модели, имитирующей ФК у больных, было выполнено секвенирование РНК. После обработки колистином (продолжительная инфузия раствора 2 мг/л) было идентифицировано более 400 генов с изменившейся регуляцией, многие из которых были связаны с биогенезом наружной мембраны, метаболизмом жирных кислот и обменом фосфолипидов. После обработки дорипенемом ($C_{\max}$ 25 мг/л, $t_{1/2}$ 1,5 час) в течение 15 мин экспрессия генов не изменилась, но через 1 ч роста в этих условиях было идентифицировано 45 генов с изменившейся экспрессией. Обработка *A.baumannii* комбинацией колистина и дорипенема в течение 1 ч привела к изменению экспрессии у >450 генов. Более 70% изменений экспрессии этих генов наблюдали после обработки одним колистином. Полученные данные дают основание полагать, что колистин вызывает сильное повреждение наружной мембраны, облегчает липидный обмен между внутренней и наружной мембранами и изменяет нормальную асимметричную композицию наружной мембраны. Транскриптомная реакция на колистин очень сходна с наблюдаемой у ЛПС-дефицитного штамма и означает, что многие отмеченные изменения являются откликами на нестабильность наружной мембраны, вызванную утратой ЛПС.

* Environmental and Public Health Microbiology Laboratory, Department of Civil Engineering, Monash University, Clayton, Australia.

КОМБИНАЦИИ КОЛИСТИНА И ДОРИПЕНЕМА ПРОТИВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ СИНЕРГИДНОГО БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ И ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ РАЗВИТИЯ УСТОЙЧИВОСТИ.

COLISTIN AND DORIPENEM COMBINATIONS AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: PROFILING THE TIME COURSE OF SYNERGISTIC KILLING AND PREVENTION OF RESISTANCE / N. S. LY, J. B. BULITTA, G. G. RAO, C. B. LANDERSDORFER, P. N. HOLDEN, A. FORREST, P. J. BERGEN, R. L. NATION, J. LI, B. T. TSUJI* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 5: 1434–1442.

Колистин является «старым» лекарством, повышенное применение которого в настоящее время вызвано ограниченным терапевтическим выбо-

ром. Но при монотерапии колистином возникает устойчивость к нему, поэтому задачей исследования было создать оптимальные комбинации, содержащие колистин, в отношении *Pseudomonas aeruginosa* за счёт определения синергидного бактерицидного действия во времени и предупреждения развития устойчивости. На моделях инфекции с применением диализных мембран (HFIM) на протяжении свыше 10 дней имитировали действие клинически релевантных режимов дозирования колистина и дорипенема на 2 гетерорезистентные штамма *P.aeruginosa* (МПК 1 мг/л) и один резистентный (МПК 128 мг/л) штамм (инокулом $10^{9.3}$ КОЕ/мл). Были разработаны новые математические модели с использованием S-ADAPT. Обработка одним колистином гетерорезистентных штаммов *P.aeruginosa* оказывала бактерицидное действие (свыше $2,64 \log_{10}$ КОЕ/мл) в течение 24 ч с последующим вторичным ростом. Использование комбинаций с высокоинтенсивным действием, обеспечивающих постоянную концентрацию свободного колистина 5 мг/л, приводило к полной эрадикации (бактерицидность $>9,3 \log_{10}$) в течение 48 ч. Синергидный эффект таких комбинаций достигал $9,38 \log_{10}$ и превосходил по бактерицидности самую активную монотерапию. В отношении колистиноустойчивого штамма комбинация антибиотиков оказывала заметное синергидное действие, снижая количество бактерий на $6,11 \log_{10}$ КОЕ/мл в течение 72 ч с последующим вторичным ростом. С помощью математических моделей были рассчитаны общая и устойчивая субпопуляции и предполагаемый синергизм между колистином и дорипенемом. Результаты исследования дают представление об оптимальном действии антибиотиков и могут служить рамочным форматом для разработки новых антибиотических комбинаций и их моделирования.

* Laboratory for Antimicrobial and Bacterial Dynamics, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University at Buffalo, State University of New York, Buffalo, NY, USA.

ОЦЕНКА КОМБИНАЦИИ МИНОЦИКЛИНА И ПОЛИМИКСИНА В В ОТНОШЕНИИ *ACINETOBACTER BAUMANNII*.

ASSESSMENT OF MINOCYCLINE AND POLYMYXIN B COMBINATION AGAINST *ACINETOBACTER BAUMANNII* / D. R. BOWERS, H. CAO, J. ZHOU, K. R. LEDESMA, D. SUN, O. LOMOVSKAYA, V.H. TAM* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2015; 2015: 59: 5: 2720–2725.

Антибиотическая устойчивость среди штаммов *Acinetobacter baumannii* повсеместно увеличивается,

часто делая необходимым применение комбинированной терапии. Клиническое значение комбинации миноциклина с полимиксином В недостаточно определено. Изучали активность миноциклина и полимиксина В в отношении 1 лабораторного и 3 клинических штаммов *A.baumannii*. Тестирование чувствительности к миноциклину выполняли как в присутствии ингибитора помпового выброса — фенилаланин-аргинин β -нафтиламида (РА β N), так и без него. Внутриклеточную концентрацию миноциклина определяли без полимиксина В и при его добавлении (0,5 мкг/мл). Также определяли бактерицидное действие во времени (time-kill) клинически релевантных концентраций миноциклина (2 мкг/мл и 8 мкг/мл) и его комбинации с полимиксином (0,5 мкг/мл) на протяжении 24 ч при 10⁶ КОЕ/мл каждого штамма. Эффективность *in vivo* комбинации оценивали на модели пневмонии у нейтропенических мышей. Инфицированным животным вводили миноциклин (50 мг/кг) или полимиксин В (10 мг/кг), или оба антибиотика до достижения экспозиций, эквивалентных клиническим. В присутствии РА β N наблюдалось снижение МПК миноциклина (≥ 4 раз). Внутриклеточная концентрация и *in vitro* бактерицидный эффект миноциклина усиливались полимиксином В. Бактериальная нагрузка в лёгочной ткани 2 чувствительных к миноциклину штаммов значительно снижалась под действием комбинации антибиотиков по сравнению с монотерапией миноциклином или полимиксином В. Комбинация антибиотиков, кроме того, продлевала выживание животных, инфицированных чувствительным к миноциклину штаммом. Итак, полимиксин В увеличивал внутриклеточную концентрацию миноциклина у бактерий и усиливал его бактерицидную активность, по-видимому, нарушая помповый выброс. Клиническую значимость данной комбинации ещё предстоит исследовать.

* Department of Clinical Sciences and Administration, University of Houston College of Pharmacy, Houston, Texas, USA.

ТЕТРАЦИКЛИНЫ В ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ *ACINETOBACTER BAUMANNII* С МУЛЬТИЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ. ОБЗОР.

TETRACYCLINES FOR MULTIDRUG-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* INFECTIONS / M. E. FALAGAS*, K. Z. VARDAKAS, A. KAPASKELIS, N. A. TRIARIDES, N. S. ROUSSOS // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIBACTERIAL AGENTS 2015; 45: 5: 455—460.

Инфекции, вызванные *Acinetobacter baumannii* с мультилекарственной устойчивостью (MDR),

представляют серьёзную глобальную угрозу. Поскольку новые препараты ещё не разработаны, приоритетным является знание эффективности и безопасности старых антибиотиков. В настоящем систематическом обзоре были суммированы имеющиеся клинические данные по лечению *A.baumannii* инфекций тетрациклинами. Были оценены 10 ретроспективных исследований, относящихся к использованию доксициклина и миноциклина при лечении 185 *A.baumannii* инфекций (65,4% которых были респираторными, а 13% — инфекциями кровотока) у 156 больных. В большинстве случаев (86,4%) тетрациклины вводили в комбинации с другими препаратами. Обычная доза доксициклина или миноциклина составляла 100 мг в/в или перорально дважды в сутки (обычная ударная доза миноциклина 200 мг). Клинический успех был достигнут у 120 (76,9%) больных из 156, в том числе у 87 (71,9%) из 121 с респираторными инфекциями и у 21 (87,5%) из 24 с инфекциями кровотока. В 100 зафиксированных случаях было 22 смертельных исхода. Микробиологическая эрадикация достигала 71,3% (72/101 случая) в рассмотренных случаях, задокументированная микробиологическая эрадикация достигала 66,3% (59/89 случаев). Побочные явления были отмечены только в 1 из 88 эпизодов. Притом что тетрациклин-содержащие режимы лечения демонстрировали обнадеживающие результаты, для определения значения этих антибиотиков при лечении MDR *A.baumannii* инфекций необходимы данные более крупных сравнительных исследований.

* Alfa Institute of Biomedical Sciences (AIBS), 9 Neapoleos Street, 151 23 Marousi, Athens, Greece.

* Corresponding author at: Corresponding author. Present address.: Tel.: +30 210 683 9604; fax: +30 210 683 9605.

УСТОЙЧИВОСТЬ *ACINETOBACTER BAUMANNII* К КОЛИСТИНУ: СВЕРХ УСТОЙЧИВОСТИ К КАРБАПЕНЕМАМ.

COLISTIN-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*: BEYOND CARBAPENEM RESISTANCE / Z. A. QURESHI, L. E. HITTLE, J. A. O'HARA, J. I. RIVERA, A. SYED, R. K. SHIELDS, A. W. PASCULLE, R. K. ERNST, Y. DOI* // CLINICAL INFECTIOUS DISEASES 2015; 60: 9; 1295—1303.

С увеличением применения колистин метансульфоната (КМС) при лечении инфекций, обусловленных устойчивым к карбапенемам *Acinetobacter baumannii*, наблюдается появление устойчивости к колистину. Больные с инфекцией или колонизацией колистиноустойчивым (КУ) *A.baumannii*

были выявлены в больницах Пенсильвании. Из электронных медицинских источников были собраны клинические данные и выполнены тестирование чувствительности, гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) и мультилокусное типирование (MLST) штаммов. Для выяснения механизма устойчивости к колистину был исследован липид А методом лазерной десорбции/ионизации с использованием матрицы. У 20 больных был идентифицирован КУ штамм *A.baumannii*. Основным видом инфекции была вентилятор-ассоциированная пневмония. До идентификации КУ штаммов 19 больных с инфекцией, обусловленной устойчивым к карбапенемам и чувствительным к колистину *A.baumannii*, получали в/в или в виде ингаляции КМС. Показатель 30-дневной смертности составил 30%. Режим лечения КУ *A.baumannii* инфекции, включающий комбинацию КМС+карбапенем+ампициллин-сульбактам, характеризовался самым низким уровнем смертности. Чувствительные и устойчивые штаммы, выделенные от одного пациента, имели родственные пульсотипы (PFGE), тогда как штаммы, полученные от разных больных отличались по этому признаку, что, возможно, было результатом эволюции в ходе лечения КМС. По данным MLST, все штаммы относились к международному клону II, имеющему эпидемическое происхождение. У всех КУ штаммов *A.baumannii* присутствовала фосфоэтноламинаовая модификация липида А. Итак, КУ *A.baumannii* был выделен исключительно у больных, получавших КМС при лечении инфекции, вызванной устойчивым к карбапенемам и чувствительным к колистину штаммом *A.baumannii*. Устойчивость к колистину объяснялась фосфоэтноламинаовой модификацией липида А. Штаммы, выделенные от больных, леченных КМС, следует тестировать на чувствительность к колистину.

* Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of Pittsburgh School of Medicine, S829 Scaife Hall, 3550 Terrace St, Pittsburgh, PA 15261, USA.

ЛЕЧЕНИЕ КОЛИСТИНОМ БОЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЕЙ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ УСТОЙЧИВЫМ К КАРБАПЕНЕМАМ *ACINETOBACTER BAUMANNII*: СЛУЧАИ НЕФРОТОКСИЧНОСТИ И ИСХОДЫ.

COLISTIN TREATMENT IN CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* PNEUMONIA PATIENTS: INCIDENCE OF NEPHROTOXICITY AND OUTCOMES / K. H. KWON, J. Y. OH, Y.-S. YOON, Y.-J. JEON, K. S. KIM, S. J. SHIN, J. W. CHUNG, H. J. N. HUH, S. L. CHAE, S. Y. PARK* // IJAA, JUNE 2015: 45: 6: 605—609.

Колистиметат натрия (КМН) всё больше применяются при лечении инфекций, возбудителем которых являются грамотрицательные бактерии (ГОб) с мультилекарственной устойчивостью. Однако не приведено оценки частоты случаев КМН-ассоциированной нефротоксичности у больных с пневмонией, обусловленной карбапенемоустойчивым *Acinetobacter baumannii* (КУАБ). Было проведено ретроспективное исследование 120 больных с КУАБ пневмонией, леченных в/в КМН в течение ≥ 72 ч. Задача исследования состояла в определении факторов риска возникновения КМН-индуцированной нефротоксичности и 30-дневной смертности больных с КУАБ пневмонией. Из 120 больных с КУАБ пневмонией у 61 (51%) развилась нефротоксичность. Многофакторный анализ показал, что КМН-ассоциированная нефротоксичность связана с величиной дозы на идеальную массу тела (ИБТ) (OR=1,28, 95% ДИ 1,01—1,62; $p=0,04$), индексом Карлсона сопутствующей заболеваемости (OR=1,31, 95% ДИ 1,06—1,60; $p=0,01$) и септическим шоком (OR=3,16, 95% ДИ 1,32—7,60; $p=0,01$). Показатель 30-дневной смертности составлял 33% (39/120). Как показал многофакторный анализ, повышенные суточные дозы КМН/ИБТ [отношение рисков (HR) = 0,81, 95% ДИ 0,67—0,98; $p=0,03$] и более продолжительная терапия КМН (HR = 0,86, 95% ДИ 0,79—0,95; $p=0,002$) ассоциировались с повышенной выживаемостью. Септический шок (HR = 3,91; 95% ДИ 1,95—7,83; $p<0,001$) и назначение кортикостероидов (HR = 3,49; 95% ДИ 1,67—7,28; $p=0,001$) были связаны с пониженной выживаемостью больных КУАБ пневмонией. Более высокие суточные дозы КМН/ИБТ, индекс Карлсона сопутствующей заболеваемости и септический шок являются существенными факторами риска развития КМН-ассоциированной нефротоксичности. Однако, КМН-ассоциированная нефротоксичность, по видимому, не влияет на показатель смертности.

* Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Dongguk University, Ilsan Hospital, Goyang-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea.

ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ОПН) У БОЛЬНЫХ, ЛЕЧЕННЫХ ПОЛИМИКСИНОМ В, И ВЛИЯНИЕ ОПН НА СМЕРТНОСТЬ: МНОГОЦЕНТРОВОЕ ПРОСПЕКТИВНОЕ КОГОРТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.

RISK FACTORS FOR ACUTE KIDNEY INJURY (AKI) IN PATIENTS TREATED WITH POLYMYXIN B AND INFLUENCE OF AKI ON MORTALITY: A MULTICENTRE PROSPECTIVE COHORT STUDY // M. H. RIGATTO, T. F. BEHLE, D. R. FALCI, T. FREITAS, N. T. LOPES,

M. NUNES, L. W. COSTA, A. P. ZAVASCKI* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 5: 1552—1557.

Целью исследования было оценить факторы риска развития острой почечной недостаточности (ОПН) у больных, леченных полимиксином В как последним средством против инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, с акцентом на дозу, и определить влияние ОПН на смертность у данных больных. Было выполнено многоцентровое проспективное когортное исследование, включающее больных в возрасте ≥ 18 и леченных в/в полимиксином В на протяжении ≥ 48 ч. Первичным показателем считали развитие ОПН согласно критериям RIFLE, вторичным — смертность в течение 30 дней и декомпенсационную стадию ОПН. Использовали многофакторный анализ и модель регрессии по Коксу. Вероятность развития ОПН определяли на модели регрессивного логистического анализа. В исследование было включено 410 больных, ОПН была отмечена у 189 (46,1%) из них. Фактором риска ОПН была доза полимиксина В ≥ 150 мг/сутки (адаптированный HR=1,95; 95% ДИ=1,31—2,89, $p=0,01$). Повышенный вес и пожилой возраст независимо ассоциировались с ОПН. Вероятность развития ОПН значительно возрастала при дозах в пределах 150—199 мг/сутки, независимо от веса больного, и незначительно увеличивалась при более высоких дозах. Повышенный вес также увеличивал риск у больных, получавших такие суточные дозы. ОПН ассоциировалась с повышенным риском 30-дневной смертности (адаптированный HR=1,35; 95% ДИ=0,99—1,85; $p=0,06$), тогда как доза ≥ 150 мг/сутки не повышала риск, несмотря на то что ассоциировалась с ОПН. Таким образом, общая доза полимиксина В тесно связана с риском развития ОПН, независимо от веса больного. Риск 30-дневной смертности имеет тенденцию повышаться у больных с развитием ОПН. Взаимозависимость между дозой, ОПН и смертностью в дальнейшем должна быть изучена в исследованиях, специально спланированных для оценки последнего показателя.

* Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil.

IN VITRO АКТИВНОСТЬ ГЕНТАМИЦИНА, ВАНКОМИЦИНА И АМИКАЦИНА В КОМБИНАЦИИ С ЭДТА ИЛИ L-АРГИНИНОМ В ФОРМЕ ЛОК-ТЕРАПИИ В ОТНОШЕНИИ ШИРОКОГО СПЕКТРА ПЛЁНКООБРАЗУЮЩИХ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ИНФЕКЦИЯХ КРОВотоКА, ОБУСЛОВЛЕННЫХ КАТЕТЕРИЗАЦИЕЙ.

IN VITRO ACTIVITY OF GENTAMICIN, VANCOMYCIN OR AMIKACIN COMBINED WITH EDTA OR L-ARGININE AS LOCK THERAPY AGAINST A WIDE SPECTRUM OF BIOFILM-FORMING CLINICAL STRAINS ISOLATED FROM CATHETER-RELATED INFECTIONS / D. LEBEAUX*, V. LEFLON-GUIBOUT, J.-M. GHIGO, C. BELOIN // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 6: 1704—1712.

Лечение катетер-ассоциированных инфекций кровотока (КАИК) затруднено из-за характерной для бактериальных биоплёнок толерантности к антибиотикам. Предметом исследования было определение влияния комбинации антибиотиков и щелочной аминокислоты L-аргинина или катионного хелатора ЭДТА на гибель бактерий в *in vitro* биоплёнках, образуемых серией клинических штаммов, ответственных за КАИК и представляющих эпидемиологически значимые виды бактерий. Из 32 ранее описанных штаммов были отобраны наиболее толерантные к антибиотикам штаммы, в т.ч. коагулазонегативные стрептококки (КоНС) ($n=4$), *Staphylococcus aureus* ($n=4$), *Enterococcus faecalis* ($n=2$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n=4$) и Enterobacteriaceae ($n=4$). Для проверки толерантности биоплёнки и тестирования различных комбинаций антибиотиков с не антибиотическими вспомогательными соединениями использовали *in vitro* модель биоплёнки (планшет с 96 ячейками). Гентамицин, амикацин и ванкомицин комбинировали с динатриевой солью ЭДТА или L-аргинином для обработки методом лок-терапии. Гибель бактерий биоплёнки измеряли по числу КОЕ после энергичного перемешивания пипетированием для полного отделения клеток биоплёнки от поверхности стенок ячейки. Оба адъювантных соединения значительно увеличивали действие антибиотиков на биоплёнки, образованные грамположительными и грамотрицательными патогенными бактериями. Комбинация гентамицин+ЭДТА была активна в отношении всех испытанных штаммов, кроме *P.aeruginosa*. Комбинация гентамицина с L-аргинином была активна в отношении большинства испытанных штаммов, за исключением КоНС. Была продемонстрирована активность комбинаций амикацин+ЭДТА в отношении грамотрицательных и ванкомицин+ЭДТА в отношении грамположительных бактерий. Добавление ЭДТА, таким образом, усиливало активность гентамицина, амикацина и ванкомицина в отношении биоплёнок, образуемых широким кругом бактериальных видов, возбудителей КАИК.

* Hôpital Necker Enfants Malades, Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur, 149 Rue de Sèvres, 75743 Paris cedex 15, France.

**ЦЕФТОЛОЗАН-ТАЗОБАКТМ+МЕТРОНИДАЗОЛ
ПРИ ОСЛОЖНЁННЫХ ИНТРААБДОМИНАЛЬНЫХ
ИНФЕКЦИЯХ В ЭРУ МУЛЬТИЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ: РЕЗУЛЬТАТЫ
РАНДОМИЗИРОВАННОГО, ДВОЙНОГО
СЛЕПОГО ИСПЫТАНИЯ 3-Й ФАЗЫ (ASPECT-CIAI).**

**CEFTOLOZANE/TAZOBACTAM PLUS METRONIDAZOLE
FOR COMPLICATED INTRA-ABDOMINAL INFECTIONS
IN AN ERA OF MULTIDRUG RESISTANCE: RESULTS
FROM A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PHASE 3
TRIAL (ASPECT-CIAI) / J. SOLOMKIN*, E. HERSHBERGER,
B. MILLER, M. POPEJOY, I. FRIEDLAND, J. STEENBERGEN,
M. YOON, S. COLLINS, G. YUAN, P. S. BARIE,
C. ECKMANN // CLINICAL INFECTIOUS DISEASES 2015;
60: 10: 1462—1471.**

Растущая устойчивость к антибиотикам у патогенов, вызывающих осложнённые интраабдоминальные инфекции (оИАИ), требует разработки новых антимикробных средств. Новый антимикробный препарат цефтолозан-тазобактам, активен в отношении *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью и большинства энтеробактерий, продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра. Было выполнено проспективное рандомизированное двойное слепое испытание, оценивающее безопасность и эффективность цефтолозана-тазобактама при осложнённых интраабдоминальных инфекциях (ASPECT-CIAI). Госпитализированные больные с оИАИ получали цефтолозан-тазобактам (1,5 г) + метронидазол (500 мг) каждые 8 ч либо меропенем (1 г) в/в каждые 8 ч на протяжении 4—14 дней. Задачей испытания было продемонстрировать статистически подобные уровни клинического излечения при отложенных обследованиях (24—32 дня от начала терапии) по микробиологическим показателям в популяциях изначально рандомизированных больных (первичные) и микробиологически оцененных (вторичные), при допустимой относительной ошибке 10%. Также оценивали микробиологические исходы и безопасность. Комбинация цефтолозан-тазобактам+метронидазол не уступала меропенему по первичным (83,0%; 323/389 против 87,3%; 364/417, значимое различие -4,2%; 95% ДИ от -8,91 до 5,4) и вторичным (94,2%; 259/275 против 94,7%; 304/321, значимое различие -1,0%; 95% ДИ от -4,52 до 2,59) конечным показателям, укладываемаясь в предопределённые границы. У больных, инфицированных продуцирующими БЛРС энтеробактериями, показатель клинического излечения составил 95,8% (23/24) и 88,5% (23/26), а у больных, инфицированных СТХ-М-14/15 БЛРС продуцентами, 100% (13/13) и 72,7% (8/11) соответственно в группах, получавших цефтолозан-тазобактам+ метронидазол и меропенем. Частота

побочных эффектов была сходной в обеих группах (44,0% против 42,7%), наиболее общими были тошнота и диарея. Таким образом, лечение взрослых больных с оИАИ, обусловленных патогенами с мультилекарственной устойчивостью, комбинацией цефтолозан-тазобактам+ метронидазол не уступает лечению меропенемом.

* Department of Surgery, University of Cincinnati College of Medicine, 6005 Given Rd, Cincinnati, Ohio 45243.

**БЫСТРАЯ ИНДУКЦИЯ ВЫСОКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
К КАРБАПЕНЕМУ У ГЕТЕРОРЕЗИСТЕНТНОЙ
КРС-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*.**

**RAPID INDUCTION OF HIGH-LEVEL CARBAPENEM
RESISTANCE IN HETERORESISTANT KPC-PRODUCING
KLEBSIELLA PNEUMONIAE / S. ADAMS-SAPPER,
S. NOLEN, G. F. DONZELLI, M. LAL, K. CHEN,
L. H. J. DA SILVA, B. M. MOREIRA, L. W. RILEY* //
ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY
2015; 59: 6: 3281—3289.**

Штаммы энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазу *Klebsiella pneumoniae* (КРС), широко распространены и представляют серьёзную угрозу для здравоохранения. Часто продуценты КРС демонстрируют низкий уровень устойчивости к карбапенемам, который может быть недооценён при определении штаммов автоматическими клиническими системами. На примере 8 штаммов *Klebsiella pneumoniae* с гетерогенной устойчивостью к имипенему была предпринята попытка выяснить факторы, обуславливающие переход от чувствительности к имипенему до высокого уровня устойчивости к нему при определении согласно клиническим лабораторным стандартам тестирования. Анализ результатов «time-kill» исследования при экспозиции инокуляма 3×10^6 КОЕ/мл с $8-16 \times$ МПК имипенема показал гибель популяции на 99,9%. Однако, через 20 ч инкубации при той же концентрации популяция полностью восстанавливалась. Характеристика популяции показала, что восстановление происходило за счёт гетерорезистентной субпопуляции с частотой $2 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-6}$. Образцы, отобранные через 2 часа после экспозиции с имипенемом, были так же чувствительны, как исходный штамм до экспозиции и продуцировали основной порин внешней мембраны OmpK36. Через 4—8 ч экспозиции OmpK36 отсутствовал, а МПК имипенема возрастала в 32 раза. Отдельные колонии, выделенные через 20 ч экспозиции, представляли как чувствительную, так и устойчивую субпопуляцию. Однажды индуцированная высокая устойчивость к имипенему сохранялась, а экспрессия

OmpK36 отсутствовала даже при прерывании экспозиции с карбапенемом. Результаты исследования продемонстрировали существенную корреляцию между экспрессией *bla*_{KPC} и *ompK36*, что и определяло высокий уровень устойчивости к имипенему популяции, первоначально относящейся к карбапенемочувствительному фенотипу.

* School of Public Health, Division of Infectious Diseases and Vaccinology, University of California, Berkeley, Berkeley, California, USA.

**НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ДОСТАВКИ
АНТИМИКРОБНОГО ЛЕКАРСТВА: ПОЛУЧЕНИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФУЗОГЕННЫХ
ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ ФУЗИДИЕВУЮ КИСЛОТУ.**

**NANOTECHNOLOGY APPROACHES
FOR ANTIBACTERIAL DRUG DELIVERY:
PREPARATION AND MICROBIOLOGICAL EVALUATION
OF FUSOGENIC LIPOSOMES CARRYING FUSIDIC
ACID / D. NICOLOSI, S. CUPRI, C. GENOVESE,
G. TEMPERA, R. MATTINA, R. PIGNATELLO* //
INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL
AGENTS 2015; 45: 6: 622—626.**

Проникновение многих антибактериальных лекарств через мембрану бактериальной клетки затруднено, особенно если они имеют большой молекулярный вес или объёмную структуру. Некоторые штаммы бактерий обладают врождённой устойчивостью. Пониженная проницаемость клеточной мембраны — одна из причин устойчивости к фузидиевой кислоте (ФУЗ), бактериоста-

тическому стероидному соединению, активность которого ограничена грамположительными бактериями. Липофильный характер ФУЗ приводит к удерживанию её между двумя слоями клеточных мембран, препятствуя диффузии к мишени, находящейся в цитоплазме. Доставка антимикробного соединения к мишени с помощью липосом может стать действенной стратегией лечения инфекций, резистентных при обычно применяемых методах антимикробной терапии. Основываясь на этом, ФУЗ была заключена в фузогенные липосомы (ФЛ). Оценивали влияние маленьких однослойных фузогенных везикул, загруженных ФУЗ, на проницаемость клеточной мембраны и антибактериальный спектр антибиотика. Полученные переносчики ФУЗ были технологически охарактеризованы, и микробиологическими *in vitro* методами определена их активность в отношении некоторых штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Результаты экспериментов показали, что инкапсулированная в липосомы ФУЗ повысила антимикробную эффективность, при этом минимальная подавляющая концентрация (МПК) уменьшилась, возможно, благодаря увеличению диффузии через клеточную мембрану. Свободная ФУЗ была активна только в отношении грамположительных бактерий, тогда как инкапсулированная в ФЛ ФУЗ проявляла активность в отношении и грамотрицательных бактерий. Самые низкие значения МПК были получены для клинических штаммов *Staphylococcus epidermidis* ($\leq 0,15$ мкг/мл) и *Acinetobacter baumannii* (37,5 мкг/мл).

**Материал подготовлен Н. С. Бондаревой,
Москва**



ХОБЛ: ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА ОБОСТРЕНИЙ

БРОНХОДИЛАТОРЫ^{1,2,3,4,7}



ИНГАЛЯЦИОННЫЕ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДЫ^{1,2,3,7}



АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ^{4,5,6,7}

¹ Стандарт первичной медико-санитарной помощи при обострении хронической обструктивной болезни легких.

Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20 декабря 2012 г. № 1214-н.

² Стандарт медицинской помощи больным хронической обструктивной болезнью легких. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.11.2004 № 271

³ Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких. Российское респираторное общество. Москва, 2014.

⁴ Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С. и соавт. Инфекционное обострение ХОБЛ: Практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Пособие для врачей. Москва, 2005.

⁵ Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2011.

⁶ Herath S.C., Poole P. Prophylactic antibiotic therapy in chronic obstructive pulmonary disease. JAMA. 2014 Jun 4; 311(21): 2225-6.

⁷ Yao G.Y., Ma Y.L., Zhang M.Q., Gao Z.C. Macrolide Therapy Decreases Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation: A Meta-Analysis. Respiration. 2013 Jun 28.

Для получения дополнительной информации: ООО «Натива», 143402, Московская область, Красногорский р-н, г. Красногорск, ул. Октябрьская, д.13, тел./факс: +7 (495) 644 00 59; +7 (495) 502 16 43, info@nativa.pro, www.nativa.pro

ИНФОРМАЦИЯ ПРЕДНАЗНАЧЕНА ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ. ПЕРЕД НАЗНАЧЕНИЕМ НЕОБХОДИМО ОЗНАКОМИТЬСЯ С ИНСТРУКЦИЕЙ ПО ПРИМЕНЕНИЮ.