

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 60



11-12'2015

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

А. 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 «Литера»

Дата выхода: 26.01.2016

Свободная цена

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 60

11—12'2015

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. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.

Бибикова М. В.

Васильев А. Н.

Волжанин В. М.

Дмитриева Н. В.

Долгова Г. В.

Захарова Ю. А.

Зуева Л. П.

Ильина Е. Н.

Клясова Г. А.

Ленёва И. А.

Митрохин С. Д.

Романцов М. Г.

Сычев Д. А.

Тец В. В.

Цыбанев А. А.

Ших Е. В.

**Журнал* цитируется в: Medline; Ind Chem;
Index Medicus; Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr;
Current Contents (Life Sciences)**

Оригинальные статьи

Садыкова В. С., Кураков А. В., Коршун В. А., Рогожин Е. А., Громовых Т. И., Куварина А. Е., Баранова А. А.
Антимикробная активность веществ, продуцируемых штаммом *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ F-1228: оптимизация лабораторного культивирования и спектр действия индивидуальных пептаиболов
Бибикова М. В., Даниленко А. Н., Катлинский А. В., Корыстова А. Ф., Кублик Л. Н., Левитман М. Х., Шапошникова В. В., Корыстов Ю. Н.
Изменение ингибирующей множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток активности олигомицинов в комплексах с литием и цинком
Кузнецова М. В., Еньчева Ю. А., Самарцев В. А.
Влияние хлоргексидина и Пронтозана на смешанную и моновидовые биоплёнки, образованные *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*
Ефременкова О. В., Васильева Б. Ф., Зенкова В. А., Королев А. М., Лузиков Ю. Н., Ефименко Т. А., Маланicheva И. А., Мирчинк Е. П., Исакова Е. Б., Биланенко Е. Н., Камзолкина О. В.
Антимикробные свойства антибиотика эремоксиларина А, образуемого аскомицетным грибом из класса *Sordariomycetes* в условиях глубинного культивирования
Краснопольская Л. М., Ярина М. С., Автономова А. В., Усов А. И., Исакова Е. Б., Бухман В. М.
Сравнительное изучение противоопухолевой активности полисахаридов из мицелия *Ganoderma lucidum* в опытах *in vivo*

В помощь практикующему врачу

Вериковский В. А., Минаков О. Е., Денисова О. И., Бондаренко Е. В.
Результаты исследования чувствительности к ванкомицину метициллинорезистентных стафилококков в клинических отделениях крупного многопрофильного стационара и рекомендации по оптимизации антибактериальной терапии вызванной ими инфекции
Селихова М. С., Вдовин С. В., Михайловская М. В.
Оптимизация антибиотикопрофилактики при малых гинекологических операциях
Мазина Н. К., Мазин П. В.
Метааналитический подход к оценке клинической эффективности инфузионного сукцинатсодержащего препарата Ремаксола при патологии печени разного генеза

**Cited in: Medline; Ind Chem; Index Medicus;
Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr;
Current Contents (Life Sciences)**

Original Papers

- 3 Sadykova V. S., Kurakov A. V., Korshun V. A., Rogozhin E. A., Gromovykh T. I., Kuvarina A. E., Baranova A. A. Antimicrobial Activity of Substances Produced by *Trichoderma citrinoviride* Strain VKPM F-1228: Optimization of Cultivation and Assessment of Spectrum of Individual Peptaibols
- 9 Bibikova M. V., Danilenko A. N., Katlinsky A. V., Korystova A. F., Kublik L. N., Levitman M. Kh., Shaposhnikova V. V., Korystov Yu. N. Change of Tumor Cell Multiple Drug Resistance Inhibitory Activity of Oligomycins in Complexes with Lithium and Zinc
- 15 Kuznetsova M. V., Encheva Yu. A., Samartsev V. A. Influence of Chlorhexidine and Prontosan on Dual Species and Monospecies Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*
- 23 Efremenkova O. V., Vasiljeva B. F., Zenkova V. A., Korolev A. M., Lusikov Yu. N., Efimenko T. A., Malanicheva I. A., Mirchink E. P., Isakova E. B., Bilanenko E. N., Kamzolkina O. V. Antimicrobial Properties of Eremoxylarin A Produced by Ascomycete of *Sordariomycetes* in Submerged Culture
- 29 Krasnopol'skaya L. M., Yarina M. S., Avtonomova A. V., Usov A. I., Isakova E. B., Bukchman V. M. Antitumor Activity of Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* Mycelium: *in vivo* Comparative Study

Guidelines for Practitioners

- 35 Verikovskiy V. A., Minakov O. E., Denisova O. I., Bondarenko E. V. Results of Investigation of MRSA Susceptibility to Vancomycin in Clinical Units of Large Multifunctional Hospital and Recommendations on Optimization of Antibacterial Therapy of Staphylococcal Infection
- 39 Selikhova M. S., Vdovin S. V., Mikhailovskaya M. V. Optimization of Antibiotic Prophylaxis in Minor Gynecologic Operations
- 43 Mazina N. K., Mazin P. V. Metaanalytic Approach to Evaluate Clinical Effectiveness of Infusion Succinate-Containing Remaxol in Liver Pathologies of Diverse Genesis

По страницам журналов 50 Abstracts

Указатель авторов и статей, опубликованных в 2015 г. 59 Index of Authors and Papers Published in 2015

* 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.

Антимикробная активность веществ, продуцируемых штаммом *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ F-1228: оптимизация лабораторного культивирования и спектр действия индивидуальных пептаиболов

В. С. САДЫКОВА¹, А. В. КУРАКОВ², В. А. КОРШУН^{1,3}, Е. А. РОГОЖИН^{1,3},
Т. И. ГРОМОВЫХ⁴, А. Е. КУВАРИНА^{1,2}, А. А. БАРАНОВА^{1,4}

¹ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

³ Институт биоорганической химии им. Академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

⁴ Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва

Antimicrobial Activity of Substances Produced by *Trichoderma citrinoviride* Strain VKPM F-1228: Optimization of Cultivation and Assessment of Spectrum of Individual Peptaibols

V. S. SADYKOVA, A. V. KURAKOV, V. A. KORSHUN, E. A. ROGOZHIN, T. I. GROMOVYKH, A. E. KUVARINA, A. A. BARANOVA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Lomonosov Moscow State University, Moscow

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Biorganic Chemistry, Moscow

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

Штамм *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ F-1228 образует комплекс пептидных антибиотиков с антибактериальным и антимикотическим действием. Синтез пептаиболов тесно сопряжён со спорообразованием при выращивании штамма. Оптимальным способом культивирования для образования пептаиболов у штамма является стационарное выращивание в течение 14 сут при температуре 28°C и pH 7,5, с образованием плотной плёнки на модифицированной среде Сабуро, содержащей 30 г глюкозы и 12,5 г пептона на литр. Выделено восемь индивидуальных соединений — пептаиболов и оценен их спектр активности в отношении условно-патогенных бактерий и микромицетов, а также патогенных клинических аспергилл. Установлено, что вещества под номерами 9, 13, 14, 15 и 16 активны в отношении условно-патогенных грибов и бактерий, в том числе и метициллинорезистентного золотистого стафилококка, а соединения 9, 13 и 14 проявляли антимикотическую активность и в отношении клинических изолятов аспергилл.

Ключевые слова: пептаиболы, *Trichoderma citrinoviride*, оптимизация культивирования, антибактериальная и антимикотическая активность, клинические аспергиллы.

The *Trichoderma citrinoviride* VKPM F-1228 strain produces a complex of peptide-based antibiotics with antibacterial and antimycotic action. Synthesis of peptaibols is closely related to the conidiogenesis in the culture. The optimal procedure of the strain cultivation for production of peptaibols is stationary growing for 14 days at a temperature of 28°C and pH 7.5 followed by formation of a dense mycelium film on the modified Saburo medium containing 30 gr/l of glucose and 12.5 gr/l of peptone. Eight individual peptaibols were extracted. The spectrum of their activity was estimated with the use of opportunistic bacteria and micromycetes as well as pathogenic clinical aspergilli. Compounds 9, 13, 14, 15 and 16 were shown active against opportunistic fungi and bacteria including methicillin resistant *S.aureus*, whereas compounds 9, 13 and 14 in addition showed antimycotic activity against clinical aspergilli.

Key words: peptaibols, *Trichoderma citrinoviride*, optimization of cultivation, antibacterial and antimycotic activity, clinical aspergilli.

Введение

Пептаиболы — широкая группа линейных нерибосомальных пептидов, продуцируемых в основном почвенными аскомицетами и их анаморфами из родов *Trichoderma*, *Emericellopsis*, *Acremonium*, *Fusarium*. Эти пептиды обладают ценным спектром фармакологического значе-

ния: активны в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий, фитопатогенных и патогенных грибов, опухолевых клеток и характеризуются низкой токсичностью. Для некоторых из этих соединений показана противовирусная активность: они препятствуют синтезу капсида вирусов таких, как грипп А, везикулярный вирус стоматита, ВИЧ [1–3]. Перспективность исследования пептаиболов обусловлена тем, что к ним практически не возникает резистентность у клеток-мишеней. Самый известный в клиничес-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 119023 Москва, ул. Б.Пироговская, д. 11, НИИНА им. Г.Ф.Гаузе

кой практике пептаибол — зервамицин ПВ, синтезируемый *Emericellopsis salmosynnemata* с антибактериальным действием в отношении грамположительных бактерий и антипротозойной активностью к устойчивым формам возбудителя малярии *Plasmodium falciparum* [4].

Представители микромицетов рода *Trichoderma* интересны как продуценты новых пептаиболов, активных в отношении возбудителей дрожжевых и мицелиальных грибов, в том числе антибиотикорезистентных [5, 6]. Синтез таких пептидов некоторыми грибами в природных условиях, по-видимому, обусловлен антагонистическими взаимодействиями с фитопатогенными и почвенными микромицетами. Для растений они играют роль сигнальных молекул в активации системного иммунитета в ответ на присутствие патогенных грибов [7]. Сравнительно недавно появились сведения о выделении пептаиболов с антимикробной и противоопухолевой активностью из морских видов рода *Trichoderma* — паразитов беспозвоночных [8]. К настоящему времени имеется подробная база пептаиболов <http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol>, включающая сведения о 1043 соединениях, из которых более 600 описано для разных видов рода *Trichoderma* [9]. Все это указывает на перспективность поиска среди микромицетов этого рода продуцентов пептидных соединений, активных в отношении условно-патогенных и патогенных грибов и разработке на их основе новых антимикотиков.

Ранее нами была изучена антибиотическая активность 48 штаммов рода *Trichoderma* и выявлен штамм *Trichoderma citrinoviride* ТУVI 4/11 ВКПМ F-1228, обладающий широким спектром антимикробной активности в отношении изученных тест-организмов: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* и ряда других [10]. В качестве основного действующего вещества был идентифицирован комплекс мембрано-активных пептидов — пептаиболов [11].

Целью работы было подобрать оптимальные параметры культивирования для биосинтеза комплекса пептаиболов и разработать рецептуру среды, обеспечивающую повышение выхода антибиотиков.

Материал и методы

Штамм *Trichoderma citrinoviride* ТУVI 4/11 ВКПМ F-1228 отобран в результате первичного скрининга по ингибирующей активности к условно-патогенным микромицетам рода *Aspergillus*. Экстракты его культуральной жидкости (КЖ) активны также в отношении грамположительных бактерий (в том числе резистентных стафилококков) и оказывают цитотоксическое действие на линии опухолевых клеток Colo 357 и ТЗМ4. В то же время они не оказывают токсического действия на простейших (парамеции) и клетки млекопитающих (использовались сперматозоиды быка). Сам штамм-продуцент не токсичен и не зоопатогенен для высших теплокровных животных и человека [11].

Интенсивность утилизации органических соединений штаммом определяли методом Biolog Phenotype Micro Array (PM) system [12, 13].

Для обеспечения наилучшего образования целевых продуктов метаболизма исследовали влияние физических и химических факторов: температуры, pH, компонентов среды, условий культивирования. Оптимальный рост при различных температурах определяли на 3% неохмелённом сусле и среде Сабуро. Температурный режим культивирования задавали в пределах 4 градаций: 15–20°C, 20–25°C, 25–30°C и 30–35°C. Оптимум pH для синтеза штаммом антимикотиков определяли на этих же жидких средах в диапазоне от 5,0 до 9,0 с интервалом 0,5 единиц.

Для модификации состава питательной среды Сабуро проводили оптимизацию методом полного факторного эксперимента. В качестве варьируемых факторов отбирали: глюкозу и пептон. Исходные шаги для глюкозы были следующие: $x_1 = 10$ г/л с шагом 5 г/л, а для пептона $x_2 = 2,5$ г/л с шагом 2 г/л.

Определение способа культивирования штамма-продуцента для получения максимального выхода целевых пептидов проводили на оптимизированной среде Сабуро. Продуцент выращивали глубинным способом (на шейкере в течение 14 сут с перемешиванием 200 об/мин), комбинированным (7 сут на шейкере, затем — стационарно 7 сут), поверхностным способом в течение 14 сут при 25°C, мембранно-жидкостным способом на микропористой мембране фирмы Millipore размером 25 мм/0,45 мкм с подпиткой питательной средой и твердофазным культивированием на вермикулите с частицами диаметром 5 мм [14].

Определение спектра антимикотической активности комплекса антибиотиков проводили на условно-патогенных микромицетах: *Candida albicans* ATCC 2091, *C. tropicalis* INA 00763; условно-патогенных аспергиллах — *A. niger* 2K, *A. fumigatus* 4K, *A. terreus* 4K.

Исследования активности индивидуальных соединений — пептаиболов на клинических штаммах — возбудителей аспергиллёзов проводили в отделе проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом» ДЗМ. Изоляты рода *Aspergillus* были выделены из следующих источников: *A. niger* 646М — мокрота от больного инфильтративным туберкулёзом, *A. fumigatus* 397М — из операционного материала из резецированной каверны больного фиброзно-кавернозным туберкулёзом, *A. ochraceus* 497М — жидкость БАЛ от больного очаговым туберкулёзом*. Антибактериальное действие пептаиболов определяли на *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и метициллинорезистентном штамме *Staphylococcus aureus* FDA 209P.

Антибиотическое действие в отношении грибов и бактерий у штаммов оценивали с помощью стерильных бумажных дисков [Бумага фильтровальная Ф ГОСТ 12026-76], пропитанных экстрактами и высушенных в стерильных условиях. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с амфотерицином В («НИИ Пастера», 40 мкг/мл) и ампициллином («НИИ Пастера», 10 мкг/мл). Постановку и оценку результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04.

Коэффициент антибиотической активности рассчитывали по формуле: $Ka = A/K$, где Ka — коэффициент антибиотической активности гриба, мм; A — сумма диаметров зон подавления тест-объектов, мм; K — количество тест-объектов.

Культуральную жидкость экстрагировали этилацетатом в соотношении 1:2. Полученный экстракт упаривали в вакууме досуха, затем растворяли в 70% этиловом спирте.

Для фракционирования этилацетатного экстракта культуральной жидкости использовали комбинацию методов жидкостной хроматографии — прямофазной и обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной (ОФ-ВЭЖХ). В качестве сорбента для прямофазной хроматографии применяли силикагель, а в качестве элюента — хлороформ с последующим увеличением процентного содержания метанола в хло-

роформе. Полученный этилацетатный экстракт (К6) перерабатывали в этаноле и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле Kieselgel 60 (40–63 мкм); элюцию осуществляли органическими растворителями в следующей последовательности: хлороформ, хлороформ — метанол (50:1→10:1), метанол. В полученных элюатах определяли антимикробную активность методом дисков на тест-культурах грибов и бактерий. Активные элюаты были упарены в вакууме досуха и растворены в 3 мл 60% этанола.

ОФ-ВЭЖХ анализ и разделение активных фракций после прямофазной хроматографии проводили на полупрепаративной колонке Luna C₁₈ 100A размером 250×10 мм (Phenomenex, США) в линейном градиенте увеличения концентрации подвижной фазы, создаваемым элюентом А (0,1% трифторуксусная кислота (ТФУ) в воде MQ) и элюентом В (80% ацетонитрил с добавлением 0,1% водной ТФУ) при скорости потока 2,5 мл/мин. Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил фирмы Panreac (Испания). Детектирование разделяемых веществ осуществляли при длине волны 247 нм в градиенте концентрации элюента В: 16–28% — за 12 мин; 28–55% — за 27 мин; 55–75% — за 20 мин и 75–85% — за 10 мин с последующим изократическим элюированием (состав подвижной фазы не изменяется в течение всего процесса элюирования) в течение 25 мин. Полученные в ходе ОФ-ВЭЖХ-анализа фракции, соответствующие отдельным пикам, были собраны вручную. Спектр антимикробного действия веществ, содержащихся во фракциях, определяли диско-диффузионным методом, описанным выше.

Опыты проводились не менее чем в 3 повторностях. Результаты были подвергнуты статистической обработке.

Результаты исследования

На первом этапе были исследованы физиологические свойства штамма.

Метаболический профиль усвоения органических веществ штаммом был оценен методом мультисубстратного тестирования на 95 субстратах. Штамм хорошо утилизирует простые сахара, в том числе целлобиозу, циклодекстрин, трегалозу, а также активно растёт на аминокислотах: аспарагине, серине; спиртах: эритритоле, маннитоле, ксилитоле, глицероле, арабитоле; с добавлением органических кислот: фумаровой, яблочной, аспарагиновой, глюкуроновой, глюконовой, аминомасляной; с использованием глюкозида метилглюкозида; монометилового эфира янтарной кислоты и нуклеозидов: арабинозы, аденозина. Плохо усваивает углеводы — маннозу, декстрин, психозу, рамнозу, тагатозу, седогептулозу; спирты: этанол, инозитол, мальтитол; нуклеозиды: уридин; галактозиды: метилгалактозид; органические кислоты: бромоянтарную, молочную, себациновую; соли: аденозин-5-монофосфат; метиловый эфир молочной кислоты; аминокислоты: фенилаланин, треонин, орнитин. Для штамма также характерна высокая интенсивность утилизации витаминов. Полученные данные послужат основой в дальнейших работах по повышению продуктивности штамма путём введения конкретных соединений в среду.

Кислотность среды и температура являются важными факторами при культивировании продуцентов антибиотиков. Они влияют на свойства

клеточных стенок, транспорт питательных веществ, скорость роста и выход целевых продуктов [7, 8]. Установлено, что штамм хорошо растёт при температурах от 20 до 35°C, с оптимумом роста 28°C, но перестаёт продуцировать антибиотики при температуре ниже 22°C. Способность к синтезу пептаиболов наблюдается в широком диапазоне pH от 5 до 9, при этом наибольшее количество антибиотических веществ накапливается при pH 7,5 и составляет по коэффициенту активности 23 ед.

Известно, что существенное значение для продукции пептидных антибиотиков грибами имеет соотношение углерода и азота в среде, и применительно к каждому штамму-продуценту эта величина различна (4). Определение оптимального значения C/N среды Сабуро по методу полного факторного эксперимента показало, что оптимальным соотношением компонентов среды является 30 г глюкозы и 12,5 г пептона на литр. Такая среда обеспечивала стабильный синтез и выделение штаммом антибиотического комплекса в культуральную жидкость. Сопоставление абсолютных значений коэффициентов регрессии с величиной доверительного интервала (ϵ) позволяет сделать вывод, что на продукцию антибиотиков штаммом статистически значимое влияние оказывает азотсодержащий компонент среды, концентрация которого находится в лимитирующей области.

С целью дальнейшей разработки технологии штамма проводили подбор способов культивирования. Выращивание осуществляли твердофазным (на вермикулите), жидкофазным (глубинным на качалке и стационарным поверхностным) и мембранно-жидкостным способами в течение 14 суток на трёх средах разного состава (Чапек, неохмелённое 3% сусло, Сабуро). Результаты этих опытов представлены на рис. 1.

Оптимальным для выхода антибиотиков на оптимизированной среде является поверхностный способ. При культивировании этим способом штамм образовывал плотную мицелиальную плёнку на поверхности жидкой среды. Уже после нескольких суток наблюдались формирование органов спороношения и секреция антибиотиков в культуральную жидкость. Это согласуется с известным наблюдением, что синтезу пептаиболов у грибов рода *Trichoderma* предшествует стадия интенсивного конидиогенеза. Так, аспорогенный мутантный штамм *T.harzianum* переставал синтезировать комплекс пептаиболов в сравнении с исходным «диким» изолятом [7]. Близкие значения по продукции пептаиболов получены при мембранно-жидкостном культивировании штамма. И в этом случае у штамма сразу же создаются благоприятные условия для конидиогенеза, а в технологическом аспекте данный способ более предпочтителен и перспек-

Антибиотическая активность индивидуальных пептаиболов, продуцируемых штаммом *T.citrinoviride* TYVI 4/11 ВКПМ F-1228

Тест-культура	Зона подавления роста тест-культуры (мм)								Нистатин	Ампициллин
	номер индивидуального соединения									
	9	10	11	12	13	14	15	16		
Условно-патогенные штаммы										
<i>A.terreus</i> 4K	10	0	0	0	0	0	0	0	25	—*
<i>A.fumigatus</i> 5K	10	0	9	9	16	10	9	8	30	—
<i>A.niger</i> 2K	8	0	0	0	0	0	11	10	17	—
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	14	0	0	0	0	13	29	20	—	28
<i>B.coagulans</i> 429	19	0	0	0	17	17	17	19	—	25
<i>S.aureus</i> FDA 209P	20	15	0	12	22	25	25	25	—	25
Клинические штаммы										
<i>A.niger</i> 646 M	9	0	0	0	10	11	7	6	—*	—*
<i>A.fumigatus</i> 397M	6	0	0	0	6	6	6	6	—	—
<i>A.ochraceus</i> 497M	11	0	0	0	11	11	6	10	—	—

Примечание. * — нет данных.

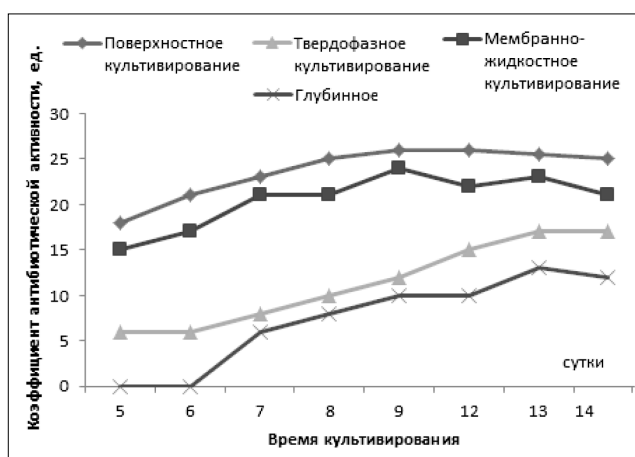


Рис. 1. Динамика накопления антибиотических веществ при разных способах культивирования *Trichoderma citrinoviride* TYVI 4/11 ВКПМ F-1228 (ошибка измерения коэффициента антибиотической активности — 1–3%).

тивен. Выход целевого продукта с его использованием планировалось увеличить путём оптимизации режима подпитки среды. Оптимизация условий культивирования позволила увеличить

выход комплекса антибиотических веществ на 7,3% по значению коэффициента активности в сравнении с исходной средой.

Активность антибиотиков в экстракте культуральной жидкости *Trichoderma citrinoviride* TYVI 4/11 ВКПМ F-1228 после проведения опытов по оптимизации состава среды, условий и способа культивирования достигала 40 ед. по стрептомицину и 80 ед. — по амфотерицину В.

Суммарная фракция пептаиболов штамма, выращенного на оптимизированной среде, была использована для подтверждения их антибиотической активности и спектра биологического действия. Методами тонкослойной хроматографии с последующим биоавтографическим проявлением на *B.subtilis* и *A.niger* было показано, что состав антибиотического комплекса и его активность остались без изменений.

С помощью полупрепаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии были выделены восемь индивидуальных соединений, у которых оценивали спектр активности в отношении условно-патогенных бактерий и микроскопических грибов, а также патогенных клинических аспергилл. Результаты антимикробной активно-

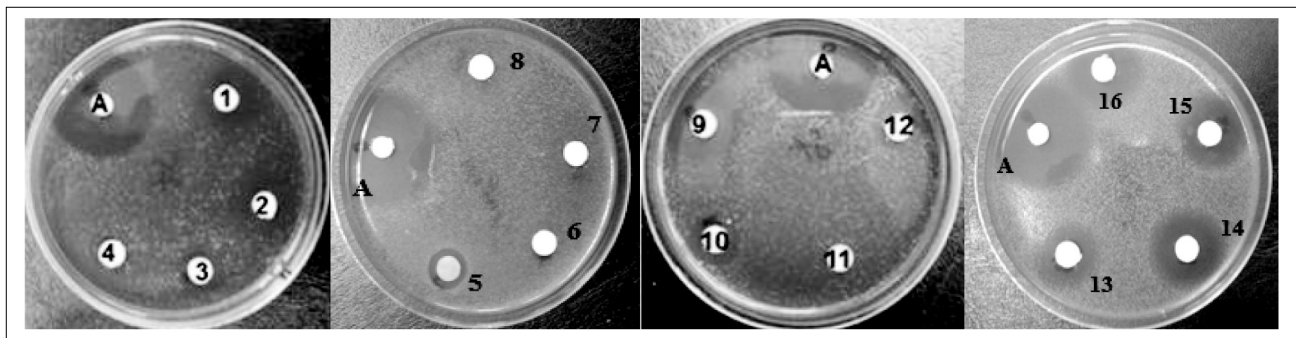


Рис. 2. Антибактериальная активность индивидуальных соединений *T.citrinoviride* TYVI 4/11 ВКПМ F-1228 в отношении метициллинорезистентного штамма *Staphylococcus aureus* F-209.

1–16 номера соединений-пептаиболов; А — ампициллин (контроль).

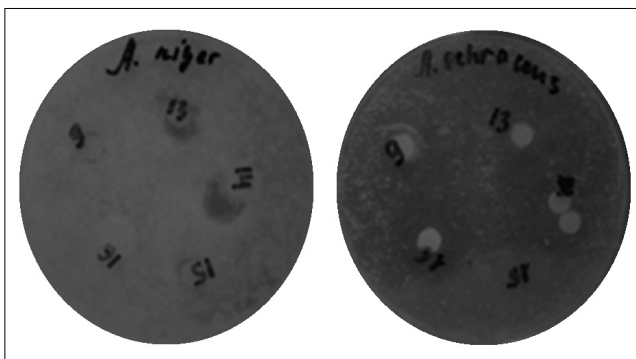


Рис. 3. Антимикотическая активность индивидуальных соединений (№ 9, 13, 14, 15 и 16) *T.citrinoviride* TYVI 4/11 ВКПМ F-1228 в отношении клинических патогенных изолятов *A.niger* 646М и *A.ochraceus* 497М.

сти индивидуальных соединений представлены в таблице и на рис. 2 и 3.

Наиболее активными в отношении условно-патогенных грибов и бактерий были индивидуальные пептаиболы № 9, 13, 14, 15 и 16. Для них характерна высокая активность в отношении золотистого стафилококка (рис. 2).

Индивидуальные соединения 9, 13 и 14 проявляли антимикотическую активность и в отношении клинических изолятов аспергилл. Они способны ингибировать рост патогенных штаммов *A.ochraceus* 497М и *A.niger* 646М — возбудителей бронхолегочного аспергиллёза, которые были резистентны к амфотерицину В (рис. 3).

Заключение

Штамм *T.citrinoviride* TYVI 4/11 ВКПМ F-1228 образует комплекс пептидных антибиотиков с антибактериальным и антимикотическим действием.

ЛИТЕРАТУРА

- Khan A., Bacha N., Ahmad B., Lutfullah G., Farooq U., Cox R. J. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4: 11: 859—870.
- Mendoza-Figueroa J., Soriano-García M., Valle-Castillo L., Méndez-Lozano J. Peptides and Peptidomics: A Tool with Potential in Control of Plant Viral Diseases. *Adv Microbiol* 2014; 4: 539—548.
- Ajesh K., Sreejith K. Peptide antibiotics: An alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. *Peptides* 2009; 30: 999—1006.
- Nagaray G., Uma V., Shivayogi M.S., Balaram H. Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi. *Antimicrob Agents Chemoter* 2001; 45: 1: 145—149.
- Daniel F. S., Filho E.R. Peptaibols of *Trichoderma*. *Nat Prod Rep* 2007; 24: 1128—1141.
- Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Z., Hatvani L., Manczinger L., Vágvölgyi C. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2005; 52: 2: 137—168.
- Kubicek C.P., Komon-Zelazowska M., Sandor E., Druzhinina I. Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma*. *IS Chem Biodivers* 2007; 4: 1068—1070.
- Ren J., Xue C., Tian L., Xu M., Chen J., Deng M., Proksch P., Lin W. Aspergillus A-F, peptaibols from the marine-derived fungus *Trichoderma asperellum*. *J Nat Prod*. 2009; 72: 1036—1044.
- Stoppacher N., Neumann N.K.N., Burgstaller L. The comprehensive peptaibiotics database. *Chem Biodiv* 2013; 10: 5: 734—743.

Синтез пептаиболов тесно сопряжён со спорообразованием при выращивании штамма. Оптимальным способом культивирования для образования антибиотиков-пептаиболов у штамма является стационарное выращивание в течении 14 суток при температуре 28°C и pH 7,5, с образованием плотной плёнки на модифицированной среде Сабуро, содержащей 30 г глюкозы и 12,5 г пептона на литр. Активность антибиотиков в экстракте культуральной жидкости *Trichoderma citrinoviride* TYVI 4/11 ВКПМ F-1228 достигала 40 ед. по стрептомицину и 80 ед. — по амфотерицину В.

Проведено выделение индивидуальных соединений пептаиболов из КЖ штамма. Установлено, вещества под номерами 9, 13, 14, 15 и 16 активны в отношении условно-патогенных грибов и бактерий, в том числе и метициллинорезистентного золотистого стафилококка, а соединения 9, 13 и 14 проявляли антимикотическую активность и в отношении клинических изолятов аспергилл.

Представляется возможным использование этого штамма, образующего несколько пептаиболов с фунгицидной и антибактериальной активностью, для дальнейших работ по созданию антибиотиков широкого спектра действия для лечения глубоких микозов, осложнённых бактериальными инфекциями и комплексных бактериально-грибных инфекций.

Работа по оптимизации условий культивирования штамма выполнялась при частичной поддержке гранта РНФ-14-50-00029.

* — Изоляты предоставлены к. б. н., в. н. с. А. Б. Кулько, за что авторы ему глубоко благодарны.

- Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е., Рогожин Е.А. Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири. *Приклад биохим микробиол* 2015; 51: 3: 1—9. / Sadykova V.S., Kurakov A.V., Kuvarina A.E., Rogozhin E.A. Antimikrobnaja aktivnost' shtammov gribov roda *Trichoderma* iz Srednej Sibiri. *Priklad biohim mikrobiol* 2015; 51: 3: 1—9. [in Russian]
- Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е., Тюрин А.П., Рогожин Е.А., Коршунов В.А. Образование штаммом *Trichoderma citrinoviride* TYVI 4/11 антибиотиков пептаиболов. *Проблем мед микол* 2015; 17: 1: 41—46. / Sadykova V.S., Kurakov A.V., Kuvarina A.E., Tjurin A.P., Rogozhin E.A., Korshun V.A. Obrazovanie shtammom *Trichoderma citrinoviride* TYVI 4/11 antibiotikov peptaibolov. *Problem med mikol* 2015; 17: 1: 41—46. [in Russian]
- Druzhinina, Schmoll M., Seiboth B., Kubicek C.P. Global carbon utilization profiles of wild type, mutant and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 2126—2133.
- Tanzer M., Arst H.N., Skalchunes A.R., Coffin M., Darveaux B.A., Heiniger R.W., Shuster J.R. Global nutritional profiling for mutant and chemical mode-of-action analysis in filamentous fungi. *Funct Integr Genomics* 2003; 3: 160—170.
- Осмоловский А.А., Баранова Н.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Егоров Н.С. Твердофазное и поверхностное мембрано-жидкостное культивирование микромицетов, особенности их развития и образования ферментов. *Приклад биохим микробиол* 2014; 50: 3: 245—255. / Osmolovskij A.A., Baranova N.A., Krejer V.G., Kurakov A.V., Egorov N.S. Tverdogfaznoe i poverhnostnoe membrano-zhidkostnoe kul'tivirovanie mikromicetov, osobennosti ih razvitiya i obrazovaniya fermentov. *Priklad biohim mikrobiol* 2014; 50: 3: 245—255. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Садыкова Вера Сергеевна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ НИИНА им. Г. Ф. Гаузе

Кураков Александр Васильевич — профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова

Коршун Владимир Аркадьевич — доктор химических наук, заведующий лабораторией химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, ведущий научный сотрудник Института биоорганической химии им. Академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Рогожин Евгений Александрович — кандидат химических наук, научный сотрудник, Институт биоорганической химии им. Академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Громовых Татьяна Ильинична — доктор биологических наук, профессор Первого МГМУ им. И. М. Сеченова

Куварина Анастасия Евгеньевна — младший научный сотрудник лаборатории химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ НИИНА им. Г. Ф. Гаузе

Баранова Анна Александровна — аспирант лаборатории химических исследований биологически активных соединений микробного происхождения ФГБНУ НИИНА им. Г. Ф. Гаузе

Изменение ингибирующей множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток активности олигомицинов в комплексах с литием и цинком

М. В. БИБИКОВА¹, А. Н. ДАНИЛЕНКО², А. В. КАТЛИНСКИЙ³, А. Ф. КОРЫСТОВА⁴,
Л. Н. КУБЛИК⁴, М. Х. ЛЕВИТМАН⁴, В. В. ШАПОШНИКОВА⁴, Ю. Н. КОРЫСТОВ⁴

¹ ВИОРИН, Москва

² Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля, РАН, Москва

³ Форт, Москва

⁴ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пущино

Change of Tumor Cell Multiple Drug Resistance Inhibitory Activity of Oligomycins in Complexes with Lithium and Zinc

M. V. BIBIKOVA, A. N. DANILENKO, A. V. KATLINSKY, A. F. KORYSTOVA,
L. N. KUBLIK, M. KH. LEVITMAN, V. V. SHAPOSHNIKOVA, YU. N. KORYSTOV

Viorin, Moscow

Emmanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow

Fort, Moscow

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, Moscow Region

Показано, что олигомицины и их комплексы с литием и цинком менее активны, чем циклоспорин А в отношении ингибирования транспортных белков, обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость клеток лимфолейкоза Р388ВР, но некоторые комплексы олигомицинов в десятки и сотни раз активнее циклоспорина А по ингибированию транспортных белков в другом типе опухолевых клеток — рака гортани человека Нер-2, что открывает возможность применения комплексов олигомицинов с литием и цинком для подавления множественной лекарственной устойчивости некоторых типов опухолей.

Ключевые слова: множественная лекарственная устойчивость, олигомицины А, В, С, SC-II, комплексы с литием и цинком.

Oligomycins and their complexes with lithium and zinc were shown to be less active vs. cyclosporin A in inhibition of transport proteins responsible for multiple drug resistance of lymphoid leukemia P388VR cells, while certain oligomycin complexes were tens or hundreds times more active than cyclosporin A by inhibition of transport proteins in another type of tumor cells, i.e. human larynx cancer Hep-2, that makes possible the use of the oligomycins complexes with lithium and zinc for inhibition of multiple drug resistance of certain tumor types.

Key words: multiple drug resistance, oligomycins A, B, C, SC-II, complexes with lithium and zinc.

Введение

Возникновение лекарственной устойчивости бактерий при инфекционных заболеваниях и опухолевых клеток у онкологических больных является серьёзной проблемой, осложняющей, а порой и не позволяющей проведение необходимой терапии пациентам. Одним из основных факторов множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) является наличие в плазматической мембране транспортных белков, использующих энергию АТФ для откачки из клеток различных соединений против градиента кон-

центраций [1, 2]. Этот процесс существенно снижает эффективность средств, используемых для терапии заболеваний, и ставит остро вопрос о необходимости поиска эффективных ингибиторов МЛУ. Ранее было показано [3], что олигомицины ингибируют откачку из опухолевых клеток субстратов транспортных белков. На клетках рака гортани человека Нер-2 олигомицин SC-II оказался намного эффективнее широко используемого ингибитора МЛУ циклоспорина А. Известно, что олигомицины образуют комплексы с литием и цинком, что меняет их гидрофобность [4] и, следовательно, может повлиять на их взаимодействие с мембранами и транспортными белками. В настоящей работе проведено исследование влияния олигомицинов и их комплексов с

© Коллектив авторов, 2015

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

литием и цинком на откачку субстратов транспортных белков из двух типов опухолевых клеток.

Материал и методы

Клетки P388 выращивали в брюшной полости мышей DBA2. Резистентные к винкристину клетки P388 получали, выращивая их в мышках-самцах DBA2 при воздействии 1 мкг/г винкристина («Gedeon Richter», Венгрия). Подробности получения устойчивого к винкристину штамма P388BP описаны в работе [5]. Клетки P388BP выделяли из брюшной полости мышей DBA2 через 7 суток после прививки и отмывали в растворе Хэнкса. Из литературы известно, что при селекции клеток P388 на устойчивость к винкристину, получается штамм устойчивый за счёт сверхэкспрессии Р-гликопротеина [6].

Олигомицины А, В, С и SC-II были получены и очищены в ООО «Виорин», а их комплексы с литием и цинком синтезированы в Институте биохимической физики им. Н. М. Эммануэля.

Для изучения действия олигомицинов на МЛЮ клеток P388BP определяли скорость откачки из клеток двух субстратов транспортных белков: ацетоксиметилового эфира кальцеина — кальцеина АМ (Molecular Probes, США) и родамина 123 — R123 (ICN, США). Транспорт из клеток кальцеина АМ определяли по методике [7]. Не флуоресцирующий ацетоксиметилэфир кальцеина (кальцеин АМ) входит в клетки по градиенту концентрации, где под действием внутриклеточных эстераз превращается во флуоресцирующий кальцеин. Эфир кальцеина откачивается из клеток транспортными белками: Р-glycoprotein (Р-рр) и multidrug resistance associated protein (MRP), ответственными за МЛЮ. Соответственно скорость образования кальцеина тем меньше, чем выше в клетках количество Р-рр и MRP. Скорость образования кальцеина в клетках, регистрируемая по увеличению его флуоресценции в кювете, зависит также от концентрации кальцеина АМ и концентрации клеток [8], поэтому сама по себе не может характеризовать ни МЛЮ, ни эффект ингибиторов. Количественно эффект ингибитора характеризуется коэффициентом увеличения скорости образования кальцеина при действии разных концентраций ингибитора. Разные ингибиторы сравниваются по максимальному коэффициенту подавления скорости и по концентрации, при которой коэффициент равен половине максимального.

Определение скорости образования кальцеина проводили следующим образом. В кювету помещали 3 мл раствора Хэнкса (37°C) с добавлением 0,5% эмбриональной сыворотки, затем 500 тыс. клеток и определяли базовый уровень флуоресценции. Кинетику образования кальцеина в клетках регистрировали после добавления к клеткам 100 нМ кальцеина АМ при постоянном перемешивании на спектрофотометре Perkin-Elmer MF44, длины волн эмиссии и поглощения 493 и 515 нм соответственно. После записи кинетики образования кальцеина в контроле в кювету добавляли олигомицины в разной концентрации и измеряли изменение кинетики образования кальцеина. Коэффициент ингибирования МЛЮ (К) определялся отношением скоростей в присутствии ингибитора и без него. В каждом опыте определялся максимальный К по эффекту на скорость образования кальцеина известного ингибитора МЛЮ циклоспорина А (Sigma, США), при концентрации 1 мкг/мл (0,8 мкМ), полностью подавляющей активный транспорт из клеток кальцеина АМ.

Транспорт родамина 123 из клеток рака гортани человека — Нер-2 определяли по методике, разработанной экспериментально и обоснованной теоретически в работе [9]. Метод применим только для клеток, прикрепляющихся к субстрату. Было показано, что отношение скоростей выхода R123 из клеток в норме и при полном подавлении активного транспорта минус единицу: (R-1)тах равно отношению активного и пассивного транспорта и, следовательно, характеризует активность в клетках белков, обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость. Клетки Нер-2 высевали в количестве 1–1,5 млн.

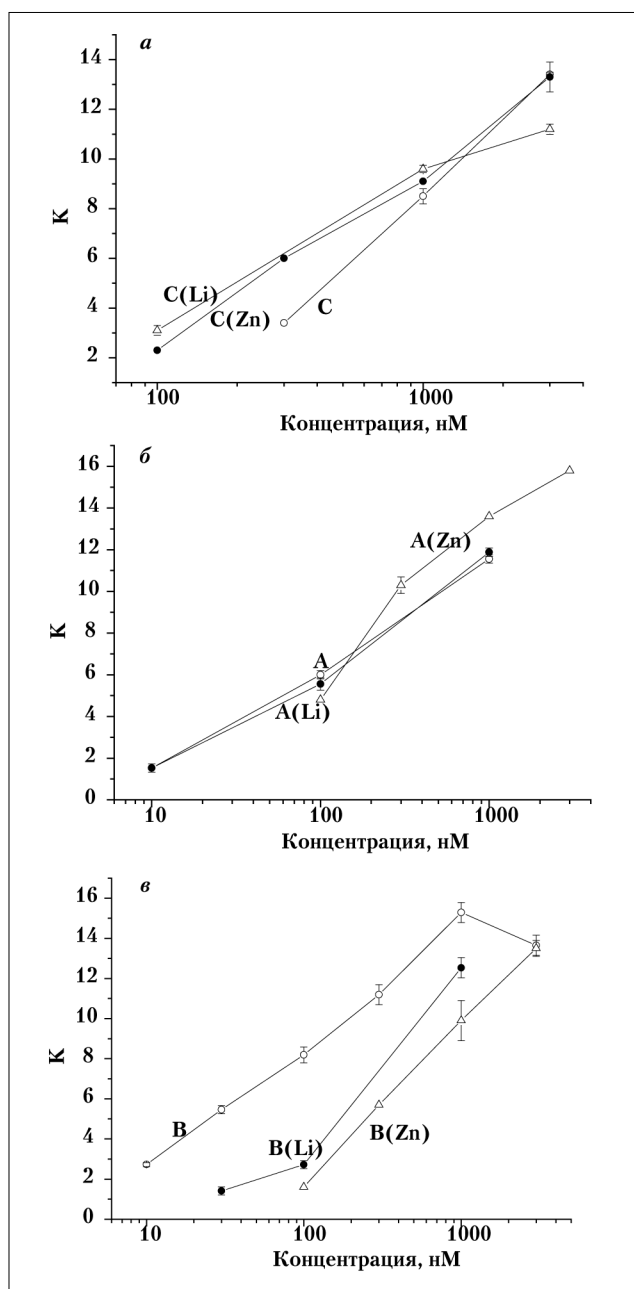


Рис. 1. Подавление олигомицином С и комплексами олигомицина С с литием и цинком (а), олигомицином А и комплексами олигомицина А с литием и цинком (б), олигомицином В и комплексами олигомицина В с литием и цинком (в) транспорта кальцеина АМ из клеток P388BP.

Здесь и на рис. 2: по оси ординат — коэффициент ингибирования транспорта кальцеина АМ.

в среде DMEM (Sigma, США) + 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США) с гентамицином на стеклянные пластинки (50×9×2 мм), помещённые в чашки Петри (ICN, США) диаметром 6 см, объём среды 8 мл. Инкубировали в CO₂ инкубаторе. Через сутки инкубации в CO₂ инкубаторе при 37°C клетки отмывали в среде RPMI1640 (Sigma, США) и нагружали их R123, при концентрации 0,5 мкг/мл в присутствии ингибитора транспортных белков циклоспорина А, 3 мкг/мл (2,4 мкМ) в среде RPMI 1640, содержащей 5% эмбриональной сыворотки в течение 60 мин, при 37°C. После инкубации клетки трижды (по

10 мин) отмывали от красителя и циклоспорина А холодным (2°C) физиологическим раствором с 1% эмбриональной сывороткой. После отмывания и до момента измерения пластинки с клетками хранили в растворе Хэнкса с 0,5% сыворотки на льду. Отмытую пластинку с клетками помещали в кювету спектрофотометра MF44 Perkin-Elmer с раствором Хэнкса и 0,5% эмбриональной сывороткой, объём 3 мл при 37° и определяли увеличение количества R123 в среде при постоянном перемешивании. Длины волн возбуждения и эмиссии 488 и 520 нм соответственно. В конце эксперимента для определения максимального количества R123 в клетках, клетки разрушали добавлением в кювету 0,02% дигитонина (Sigma, США). Матричные растворы комплексов олигомицинов с литием и цинком были приготовлены в этаноле с концентрацией 1 мг/мл.

Опыты выполняли в трёх и более повторностях и определяли квадратичную ошибку среднего значения, которая указана на рисунках.

Результаты и обсуждение

1. Влияние олигомицинов и их комплексов с литием и цинком на транспорт из клеток P388BP кальцеина АМ. Все полученные данные по влиянию олигомицинов и их комплексов на транспорт из использованных в данной работе клеток кальцеина АМ нормированы к эффекту циклоспорина А, 1 мкг/мл, значение коэффициента ингибирования транспорта, $K=16,4$. Это значение было принято за максимальный коэффициент ингибирования и IC_{50} олигомицинов и их комплексов определялось как концентрации, при которых K равно среднему между максимальным (16,4) и минимальным (1,0).

На рис. 1, 2 приведены концентрационные зависимости ингибирования транспорта кальцеина АМ из клеток олигомицинами и их комплексами с литием и цинком, а в табл. 1 значения IC_{50} и отношения IC_{50} олигомицинов к IC_{50} их комплексов. Из приведённых данных видно, что в эффективность некоторых олигомицинов в комплексах [A(Zn), C(Li), C(Zn), ScII(Li)] незначительно увеличивается, максимум в 1,5 раза. Во всех остальных комплексах эффективность олигомицинов существенно снижается: от 3 до 6 раз. Величина

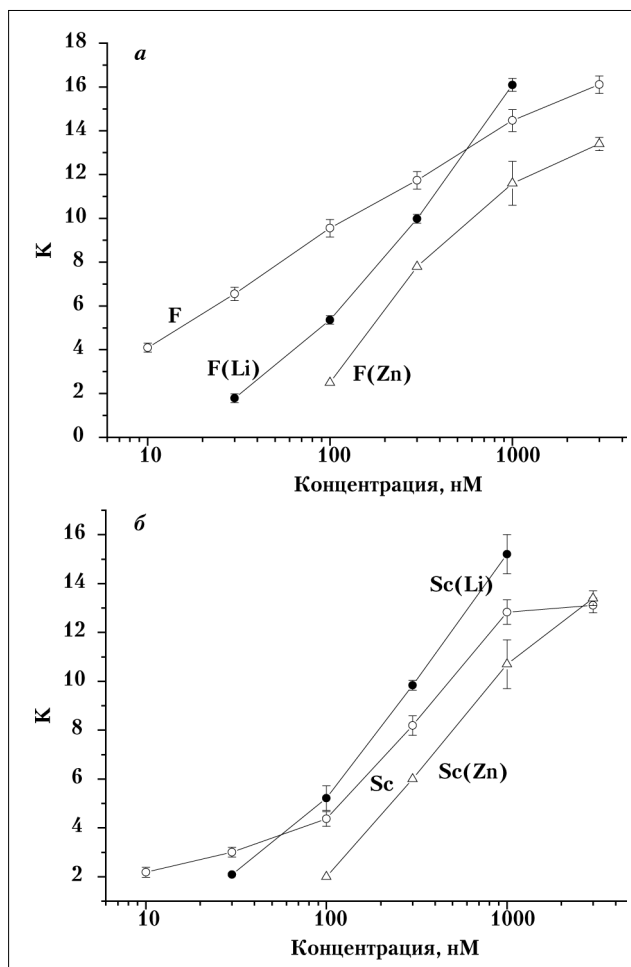


Рис. 2. Подавление олигомицином F и комплексами олигомицина F с литием и цинком (а), олигомицином ScII и комплексами олигомицина ScII с литием и цинком (б) транспорта кальцеина АМ из клеток P388BP.

IC_{50} циклоспорина А по ингибированию транспорта кальцеина АМ из клеток P388BP равна 16 нМ, то есть он эффективнее самого активного олигомицина F более чем в 4 раза, а других олиго-

Таблица 1. Влияние лития и цинка на эффективность олигомицинов по ингибированию транспорта кальцеина АМ из клеток P388BP

Олигомицин	IC_{50} , нМ	$IC_{50}/IC_{50}(Li)$ или $IC_{50}(Zn)$
A	315	1
A(Li)	315	1
A(Zn)	220	1.4
B	120	1
B(Li)	400	0.3
B(Zn)	730	0.16
C	1060	1
C(Li)	725	1.5
C(Zn)	870	1.2
ScII	350	1
ScII(Li)	225	1.6
ScII(Zn)	610	0.36
F	70	1
F(Li)	220	0.32
F(Zn)	400	0.18

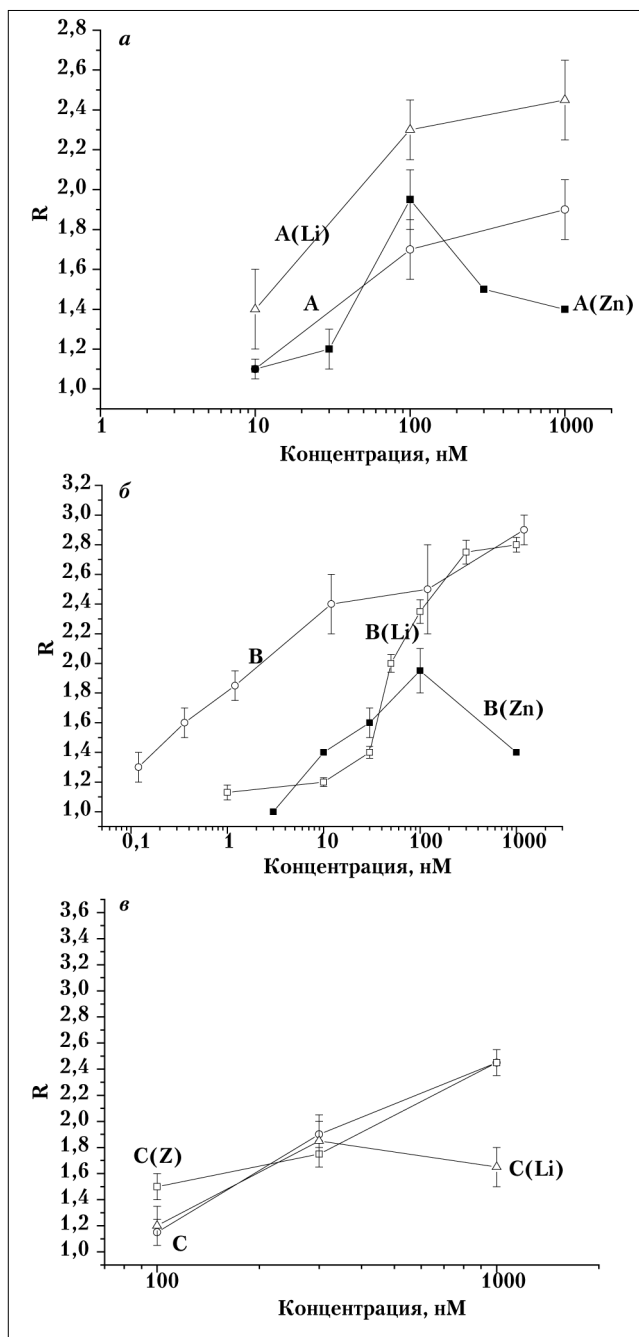


Рис. 3. Подавление олигомицином А и комплексами олигомицина А с литием и цинком (а), олигомицином В и комплексами олигомицина В с литием и цинком (б), олигомицином С и комплексами олигомицинов С(Li), С(Zn) и ScII(Zn) (в) транспорта родамина 123 из клеток Нер-2.

Здесь и на рис. 4: по оси ординат — снижение эффекта ингибирования транспорта родамина 123 из клеток.

мицинов и их комплексов в 10 и более раз. Известно, что транспорт из клеток Р388ВР кальцеина АМ осуществляется Р-гликопротеином [6], и из полученных данных следует, что олигомицины и их комплексы с литием и цинком малоперспективны как ингибиторы Р-гликопротеина.

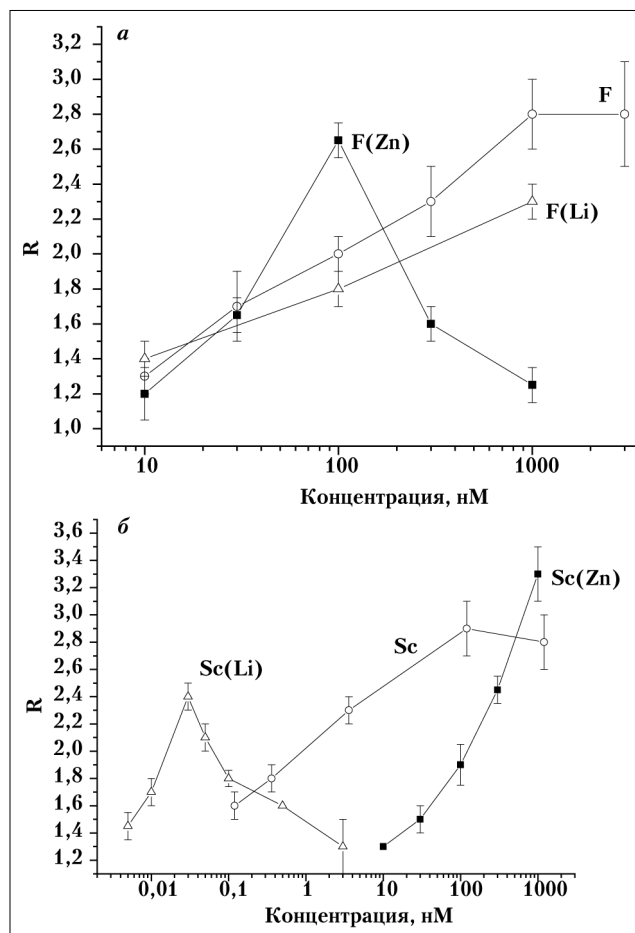


Рис. 4. Подавление олигомицином F и комплексами олигомицина F с литием и цинком (а), олигомицином ScII и комплексами олигомицина ScII с литием и цинком (б) транспорта родамина 123 из клеток Нер-2.

2. Влияние олигомицинов и их комплексов с литием и цинком на транспорт из клеток Нер-2 родамина 123. На рис. 3, 4 представлены данные по ингибированию транспорта родамина 123 олигомицинами и их комплексами с литием и цинком. На рисунках видно, что все олигомицины и их комплексы с литием и цинком ингибируют транспорт родамина 123. Большинство концентрационных зависимостей характеризуется монотонным возрастанием эффекта с увеличением концентраций. Однако для некоторых зависимостей комплексов отмечается снижение эффекта с увеличением концентрации. Так, для комплексов олигомицинов А, В и F с цинком эффект ингибирования возрастает до концентрации 100 нМ, но снижается при больших концентрациях (рис. 3, а, б, рис. 4, а). Аналогичная зависимость эффекта от концентрации наблюдается также для комплексов олигомицинов С и ScII с литием (рис. 3, в, рис. 4, б): для комплекса олигомицина С с литием при концентрациях больше 300 нМ, а для комплекса олигомицина ScII с литием при очень малых концентрациях: больше 0,03 нМ. Снижение

Таблица 2. Влияние лития и цинка на эффективность олигомицинов по ингибированию транспорта родамина 123 из клеток Нер-2

Олигомицин	IC ₅₀ , нМ	IC ₅₀ /IC ₅₀ (Li) или IC ₅₀ (Zn)
A	1000	1
A(Li)	40	25
A(Zn)	100	10
B	1,9	1
B(Li)	44	0,043
B(Zn)	100	0,019
C	300	1
C(Li)	300	1
C(Zn)	300	1
ScII	0,7	1
ScII(Li)	0,015	47
ScII(Zn)	105	0,0067
F	80	1
F(Li)	200	0,4
F(Zn)	43	1,9

эффекта ингибирования транспорта родамина 123 из клеток (R) обусловлено, по-видимому, повреждением данными комплексами плазматической мембраны и пассивным выходом родамина 123 через образовавшиеся поры. Соответственно суммарная скорость выхода родамина 123 из клеток в присутствии ингибитора возрастает за счёт увеличения его пассивного выхода.

Концентрации комплексов олигомицинов, при которых активный транспорт родамина 123 (IC₅₀) снижается вдвое, равны концентрациям, при которых R=1,95. Это среднее значение R между максимальным R=2,9 (олигомицин B(Li), 1 мкМ) и минимальным R=1. Значения IC₅₀ для олигомицинов и их комплексов приведены в табл. 2. Эти данные показывают, что в комплексе олигомицинов с литием и цинком их ингибирующая активность транспорта родамина 123 может как увеличиваться, так и уменьшаться в зависимости от типа олигомицина. Так, активность олигомицина A (IC₅₀=1000 нМ) увеличивается в комплексе с цинком (IC₅₀=100 нМ) и ещё в большей степени в комплексе с литием (IC₅₀=40 нМ). Активность олигомицина F (IC₅₀=80 нМ) увеличивается в комплексе с цинком (IC₅₀=43 нМ), но снижается в комплексе с литием (IC₅₀=200 нМ). И, наконец, активность олигомицина B (IC₅₀=1,9 нМ) существенно снижается в комплексе с обоими металлами: до IC₅₀=44 нМ в комплексе с литием и до IC₅₀=100 нМ в комплексе с цинком. Наиболее отличаются по эффекту на ингибирующую активность лития и цинка олигомицины C и ScII. Активность

олигомицина C не меняется в комплексе с обоими лигандами, а активность олигомицина ScII в комплексах изменяется в тысячи раз: IC₅₀ самого олигомицина ScII равно 0,7 нМ, в комплексе с литием — 0,015 нМ, а в комплексе с цинком — 105 нМ (табл. 2).

Олигомицины A, C, комплексы олигомицина C и комплекс олигомицина F с литием менее эффективны по сравнению с традиционным ингибитором МЛУ циклоспорином A, IC₅₀ которого равно 150 нМ. Все остальные олигомицины и их комплексы эффективнее циклоспорины A, причём олигомицин B в 80 раз, олигомицин ScII в 200 раз, а наиболее активный комплекс олигомицина ScII с литием — в 10000 раз.

Ранее было показано, что специфичность действия олигомицинов на МЛУ обусловлена особенностями опухолевых клеток, а не субстратов транспортных белков [3], поэтому полученные результаты свидетельствуют о том, что олигомицины и их комплексы менее активны, чем циклоспорин A в отношении ингибирования транспортных белков, обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость клеток лимфолейкоза P388BP, но некоторые комплексы олигомицинов в десятки и сотни раз активнее циклоспорины A по ингибированию транспортных белков в другом типе опухолевых клеток — рака гортани человека, Нер-2. Таким образом, открывается возможность применения комплексов олигомицинов с литием и цинком для эффективного подавления множественной лекарственной устойчивости некоторых типов опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ставровская А.А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Биохимия 2000; 65: 1: 112—126. / Stavrovskaja A.A. Kletochnye mehanizmy mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti opuholevyh kletok. Biohimija 2000; 65: 1: 112—126. [in Russian]
2. Van der Bliek A.M., Borst P. Multidrug resistance. Adv Cancer Res 1989; 52: 165—203.
3. Бибикова М. В., Грамматикова Н. Э., Корыстова А. Ф., Кублик Л. Н., Левитман М.Х., Шапошникова В. В., Долгих Н. В., Корыстов Ю. Н., Катлинский А. В. Олигомицины подавляют множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток. Биол мембраны 2015; 32: 2. / Bibikova M. V., Grammatikova N. E., Korystova A. F., Kublik L. N., Levitman M.H., Shaposhnikova V. V., Dolgih N. V., Korystov Ju. N., Katlinskij A. V. Oligomiciny podavljajut mnozhestvennuju lekarstvennuju ustojchivost' opuholevyh kletok. Biol membrany 2015; 32: 2. [in Russian]
4. Gierczyk B., Schroed G., Przybylski P., Brzezinski B., Bartl F., Zundel G. ESI MS, NMR and PM5 semiempirical studies of oligomycin A and its

complexes with Li⁺ and Na⁺ cations. J Mol structur 2005; 738: 1—3: 261—270.

5. Биби́кова М. В., Грамматикова Н. Э., Катлинский А. В., Коры́стов А. Ф., Кублик Л. Н., Левитман М. Х., Шапошникова В. В., Коры́стов Ю. Н. Олигомицины ScII и В подавляют пролиферацию и вызывают гибель клеток лимфолейкоза P388 и штамма, устойчивого к винкристину. Биол мембраны 2015; 32: 2: 135—140. / Bibikova M. V., Grammatikova N. Je., Katlinskij A. V., Korystova A. F., Kublik L. N., Levitman M. H., Shaposhnikova V. V., Korystov Ju. N. Oligomiciny ScII i V podavljajut proliferaciju i vyzyvajut gibel' kletok limfolejkoza P388 i shtamma, ustojchivogo k vinkristinu. Biol membrany 2015; 32: 2: 135—140. [in Russian]
6. Nagayama J., Iino M., Tada Y., Kusaba H., Kiue A., Ohshima K., Kuwano M., Wada M. Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug resistance gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent *in vivo*. Blood 2001; 97: 3: 759—766.
7. Homolya H., Hollo Z., Germann U.A., Pastan I., Gottesman M.M., Sarkadi B. Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. J Biol Chem 1993; 268: 29: 21493—21496.
8. Ермакова Н.В., Шапошникова В.В., Левитман М.Х., Ким Ю.А., Коры́стов Ю.Н. Изменение множественной лекарственной устойчивости клеток лимфолейкоза P388, устойчивых к винкристину, при росте асцитной опухоли. Биол мембраны 2004; 21: 2: 102—106. / Ermakova N.V., Shaposhnikova V.V., Levitman M.H., Kim Ju.A., Korystov Ju.N. Izmenenie mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti kletok limfolejkoza R388, ustojchivyh k vinkristinu, pri roste ascitnoj opuholi. Biol membrany 2004; 21: 2: 102—106. [in Russian]
9. Wielinga P.R., Heijn N., Westerhoff H.W., Lankelma J. 1998. A method for studying plasma membrane transport with intact cells using computerized fluorometry. Ann Biochem 1998; 263: 221—231.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Биби́кова Маргарита Васильевна — д.б.н., генеральный директор ООО «Виорин», Москва

Даниленко А.Н. — старший научный сотрудник, Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля, Москва

Катлинский Антон Викентьевич — профессор, Генеральный директор ООО «Форт», Москва

Коры́стова Антонина Николаевна — старший научный сотрудник, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Москва

Кублик Людмила Николаевна — к.б.н., старший научный сотрудник, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Москва

Левитман Мария Ханоновна — к.б.н., старший научный сотрудник, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Москва

Шапошникова Вера Владимировна — к.б.н., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Москва

Коры́стов Юрий Николаевич — д.б.н., главный научный сотрудник, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Москва

Влияние хлоргексидина и Пронтосана на смешанную и моновидовые биоплёнки, образованные *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*

М. В. КУЗНЕЦОВА^{1,2}, Ю. А. ЕНЬЧЕВА^{1,3}, В. А. САМАРЦЕВ¹

¹ Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера Минздрава РФ, Пермь

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

³ Городская клиническая больница № 21, Пермь

Influence of Chlorhexidine and Prontosan on Dual Species and Monospecies Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

M. V. KUZNETSOVA, YU. A. ENCHEVA, V. A. SAMARTSEV

E. A. Vagner Perm State Medical University, Perm

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm

Municipal Clinical Hospital No. 21, Perm

Изучено действие двух антисептических препаратов — 0,5% раствора хлоргексидина биглюконата и Пронтосана® на биоплёнки, сформированные *in vitro* референтными штаммами *P.aeruginosa* ATCC®27853 и *S.aureus* ATCC®29213 в монокультуре и в ассоциации. С помощью атомно-силовой микроскопии показано, что под действием биоцидов происходят фенотипические изменения структурной организации бактериальных биоплёнок и морфологии сессильных клеток: кокки становились меньше по диаметру, палочки укорачивались. Достоверное изменение линейных размеров клеток сопровождалось увеличением шероховатости их поверхности, более выраженное для Пронтосана®. При оценке жизнеспособности клеток выявлено, что Пронтосан® подавлял жизнеспособность бактерий в смешанной и моновидовых биоплёнках, образованных как на гидрофильной, так и на гидрофобной абиотических поверхностях. В последнем случае уменьшалась и массивность биоплёнки во всех вариантах эксперимента.

Ключевые слова: *P.aeruginosa*, *S.aureus*, моновидовые и смешанные биоплёнки, хлоргексидин, Пронтосан®.

The effect of two antiseptics, i. e. chlorhexidine bigluconate 0.5% solution and Prontosan® on dual species and monospecies biofilms formed *in vitro* by the reference strains *P.aeruginosa* ATCC®27853 and *S.aureus* ATCC®29213 was examined. It was demonstrated by atomic force microscopy that under the biocide action there occurred phenotype changes of the structural organization of the bacterial biofilms and morphology of the sessile cells: the cocci were lesser in diameter and the rods were reduced. A reliable change of linear cell sizes was accompanied by increase of their roughness (Sq) that was more pronounced for Prontosan®. When assessing the cell viability it was found that Prontosan® inhibited the bacterial viability in mixed and monospecies biofilms formed on both hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces. In the latter case the biofilm biomass (determined by crystal violet assay) lowered in all the variants of the experiment.

Key words: *P.aeruginosa*, *S.aureus*, dual species and monospecies biofilms, chlorhexidine, Prontosan®.

Введение

Согласно современным представлениям одним из основных способов выживания бактерий во внешней среде и в организме хозяина является их способность к формированию многоклеточных структур — биоплёнок [1]. Биоплёнкообразование является важной медицинской проблемой, так как обуславливает затяжной или хронический характер заболеваний микробной этиологии [2–4]. Известно, что в «зрелых» биоплёнках бактерии защищены от влияния агрес-

сивных веществ, факторов иммунной системы человека и антибактериальных препаратов, что часто является основной причиной неэффективности последних [5, 6].

Один из основных механизмов защиты клеток в биоплёнках опосредован экстрацеллюлярным матриксом, который обеспечивает структурную стабильность биоплёнки и является естественным препятствием для доступа бактерицидных агентов к бактериям. Биополимерный макромолекулярный гидратированный матрикс состоит преимущественно из микробных компонентов (экзополисахаридов, белков и внеклеточной ДНК), но может включать и элементы внутренней среды макроорганизма, например иммуног-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13. Пермский ГМУ им. акад. Е. А. Вагнера

Таблица 1. Характеристики бактерий в биоплёнках, образованных на стекле смешанной и моновидовыми культурами *S.aureus* и *P.aeruginosa*

Вариант	Длина, мкм	Ширина, мкм	Диаметр, мкм	Sq, нм
<i>S.aureus</i>	—	—	1,10±0,08	105,2±32,4
<i>S.aureus</i> +ХГ	—	—	0,86±0,10*	150±26,5*
<i>S.aureus</i> +ПП	—	—	0,85±0,04*	370±37,0*,#
<i>P.aeruginosa</i>	2,81±0,22	0,90±0,05	—	138,3±44,3
<i>P.aeruginosa</i> +ХГ	1,69±0,13*	0,98±0,12*	—	169,5±11*
<i>P.aeruginosa</i> +ПП	1,37±0,17*,#	0,94±0,01*	—	207,2±27,5*,#
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	2,45±0,37	0,99±0,24	1,28±0,18	237,5±95,2
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ХГ	н/о	н/о	1,14±0,15	336,5±38*
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ПП	н/о	н/о	1,02±0,09	397,8±47,8*,#

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с контролем в соответствующем варианте (без обработки антисептиком); # — различия статистически значимы по сравнению с ХГ ($p \leq 0,05$).

лобулины [3]. Эти данные заставили по-новому рассматривать роль местно применяемых антисептиков, а также стимулировали разработку и использование в клинике комбинированных композиций, включающих как бактерицидные вещества, так и компоненты, разрушающие защитный матрикс биоплёнки [7, 8].

Staphylococcus aureus и *Pseudomonas aeruginosa* являются одними из наиболее значимых возбудителей хирургических инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Они часто обнаруживаются на катетерах и других внедрённых в организм медицинских устройствах, а также при раневой, в том числе ожоговой, инфекции [9—13]. Учитывая, что в патогенезе большей части инфекционных осложнений лежат процессы биоплёнкообразования, представляется важным оценить влияние на биоплёнки, сформированные *S.aureus* и *P.aeruginosa*, хлоргексидина и Пронтосана® — двух антисептиков, широко используемых в хирургической практике.

Цель работы: изучить морфометрические показатели смешанной и моновидовых биоплёнок, образованных *S.aureus* и *P.aeruginosa*, после воздействия хлоргексидина и Пронтосана®.

Материал и методы

В работе использовали референтные штаммы *S.aureus* ATCC®29213 и *P.aeruginosa* ATCC®27853, полученные из ФГБУ «Государственный институт стандартизации и контроля им. Л. А. Тарасевича» Минздрава России (Москва).

Биоплёнки выращивали на покровных стеклах (18×60 мм) в бульоне Луриа-Бертани (среда LB) в чашках Петри при температуре 37°C в течение 20 ч. Затем стекла 3-кратно отмывали 0,01 М фосфатно-буферной средой (ФБС, pH 7,2±0,2), погружали на 1 ч в 0,5% водный раствор хлоргексидина биглюконата или Пронтосан® (0,1% ундециленовый амидопропил-бетаин, 0,1% полиаминопропил бигуанид — полигексанид), 3-кратно отмывали ФБС и просушивали препараты на воздухе в течение 20 мин. Концентрация хлоргексидина была выбрана в соответствии с тем, что в данной концентрации антисептик наиболее часто используется в хирургической практике. Изучение биоплёнок проводили с помощью комбинированной системы, состоящей из атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D-BIO (Asylum Research, США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Япония), в

лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета.

Подсчёт клеток и оценку их жизнеспособности выполняли после получения КЛСМ-изображений (0,12×0,12 мм), для чего биоплёнки предварительно окрашивали флуоресцентным красителем LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и 15 мин выдерживали в темноте. Количество жизнеспособных и нежизнеспособных клеток подсчитывали не менее чем в пяти полях после нанесения сетки на образец (размер ячеек 0,024×0,024 мм). Высоту биоплёнки определяли методом послойного КЛСМ-сканирования. Обработку КЛСМ-изображений осуществляли с использованием программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). Профили поверхности бактериальных биоплёнок изучали с помощью АСМ. Сканирование проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50—90 кГц и константой жёсткости 0,5—4,4 Н/м. Для определения линейных размеров клеток (диаметр для кокков, длина и ширина для палочек), характеристики структуры поверхности (шероховатость, Sq) и высоты биоплёнки получали двух- и трёхмерные топографические изображения бактерий. Обработку полученных изображений проводили с помощью программы Igor Pro 6.22A (WaveMetrics, США).

Во втором случае биоплёнки получали по методу, описанному G.F.O'Toole и R.Kolter [14]. Суточные культуры бактерий стандартизовали до 2,0 по McFarland и разводили 1:100 в LB-бульоне. В лунки полистиролового 96-луночного плоскодонного планшета (Медполимер, Россия) вносили по 0,1 мл разведённой бульонной моновидовой культуры бактерий и 0,1 мл LB-среды, при получении смешанной биоплёнки — по 0,1 мл бульонных культур обоих видов. Биоплёнки выращивали статически в термостате при температуре 37°C в течение 20 ч. После удаления планктонной культуры в опытную часть лунок вносили раствор хлоргексидина или Пронтосан®, выдерживали 1 ч, 3-кратно отмывали ФБС. Биомассу биоплёнки оценивали по уровню экстракции этанолом 0,1% водного раствора генцианвиолета, который измеряли на микропланшетном ридере Benchmark Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 580 нм в единицах оптической плотности (Ед, ОП₅₈₀). Для оценки жизнеспособности клеток в биоплёнках последние 3-кратно отмывали, вносили в лунки 100 мкл ФБС и 5-кратно обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин при 37 кГц, поместив планшеты в ультразвуковую ванну Elma Ultrasonic 30S (Elma, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) после посева из последовательных десятичных разведений бактериальных суспензий на селективные среды: желточно-солевой агар для *S.aureus* и цетримидный агар (Sigma-Aldrich, США) для *P.aeruginosa*.

Таблица 2. Толщина и количество клеток в биоплёнках, образованных на поверхности стекла смешанной и моновидами культурами *S.aureus* и *P.aeruginosa*

Вариант	Толщина биоплёнки, мкм ¹	Количество клеток на единицу площади ²	
		жизнеспособные	всего
<i>S.aureus</i>	4,85±0,57	36,4±4,6	площадь
<i>S.aureus</i> +ХГ	3,76±0,34	3,4±1,7	площадь
	$p_{(1-2)} < 0,05$	$p_{(1-2)} < 0,05$	
<i>S.aureus</i> +ПР	3,27±0,85	0	90,2±17,5
	$p_{(1-3)} < 0,05$	$p_{(1-3)} < 0,05$	$p_{(1-3)} < 0,05$
		$p_{(2-3)} < 0,05$	$p_{(2-3)} < 0,05$
<i>P.aeruginosa</i>	4,04±1,22	39,3±12,3	53,5±14,4
			$p_{(1-4)} < 0,05$
<i>P.aeruginosa</i> +ХГ	н/о	0,8±0,6	12,8±4,8
		$p_{(4-5)} < 0,05$	$p_{(2-5)} < 0,05$
			$p_{(4-5)} < 0,05$
<i>P.aeruginosa</i> +ПР	н/о	1,6±1,1	3,2±2,3
		$p_{(3-6)} < 0,05$	$p_{(4-6)} < 0,05$
		$p_{(4-6)} < 0,05$	$p_{(5-6)} < 0,05$
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	6,16±0,12	23,8±8,3	119±23
	$p_{(1-7)} < 0,05$	$p_{(1-7)} < 0,05$	$p_{(1-7)} < 0,05$
	$p_{(4-7)} < 0,05$	$p_{(4-7)} < 0,05$	$p_{(4-7)} < 0,05$
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ХГ	3,44±0,23	5,7±4,3	59,8±24,7
	$p_{(7-8)} < 0,05$	$p_{(7-8)} < 0,05$	$p_{(7-8)} < 0,05$
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ПР	3,28±0,65	0	38,2±0,5
	$p_{(7-9)} < 0,05$		$p_{(7-9)} < 0,05$
			$p_{(8-9)} < 0,05$

Примечание. ¹ — определяли путём послойного сканирования слоев биоплёнки, предварительно окрашенной флюоресцирующей меткой Live/Dead®; ² — подсчитывали не менее чем в пяти полях после нанесения сетки на образец; н/о — не определяли.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2003 и STATISTICA 6.0. Показатели представлены в виде среднего арифметического и его ошибки ($M \pm m$). Достоверность различий средних величин определяли с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.

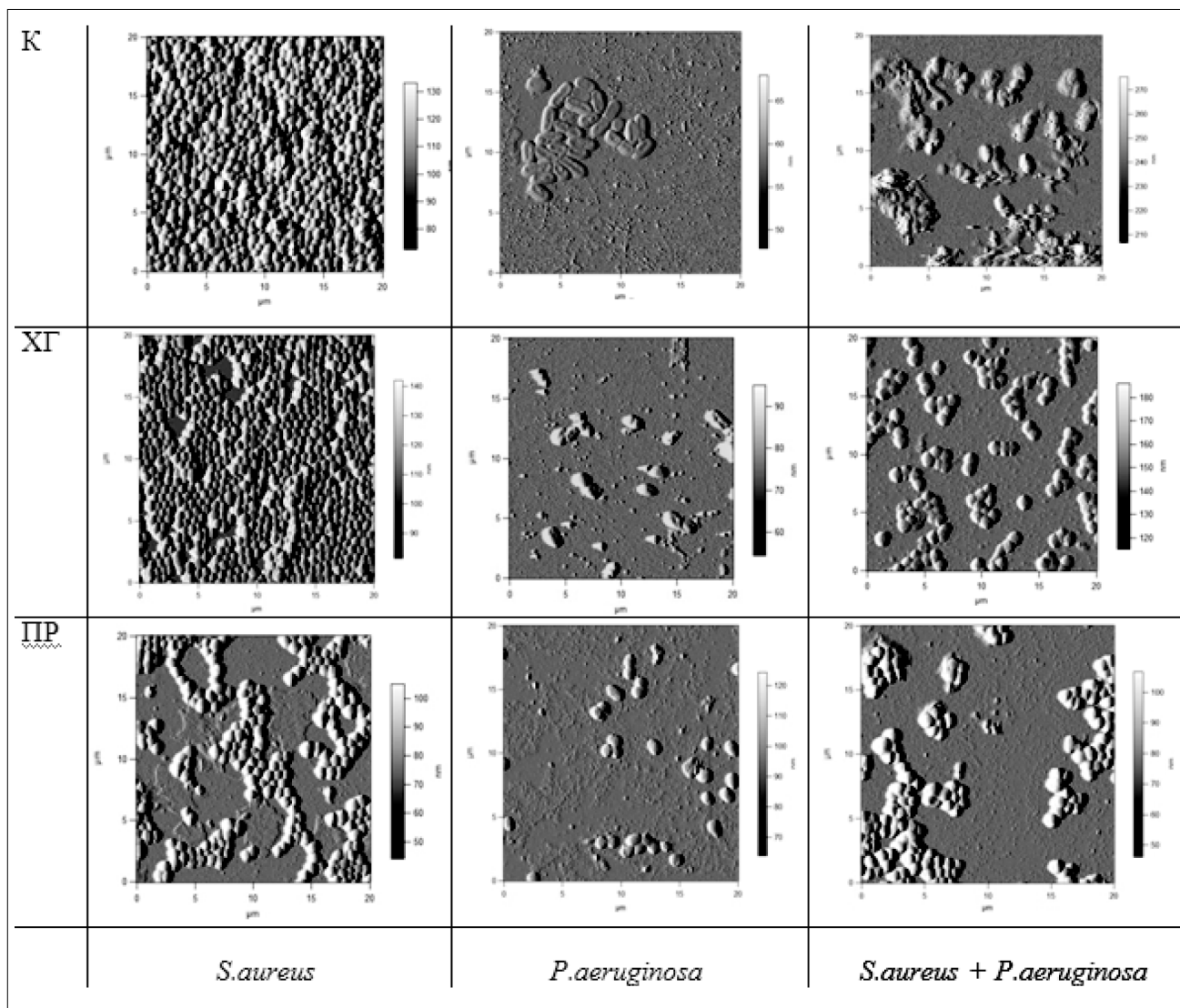
Результаты исследования

При анализе изображений, полученных с помощью АСМ, выявлено, что моновидами биоплёнка, образованная на стекле референтным штаммом *S.aureus*, представлена хорошо разросшимися кокками (диаметр отдельных бактерий составил $1,10 \pm 0,08$ мкм) и имеет структуру плотно прилегающих друг к другу клеток (рисунок). Воздействие антисептиков изменяло размер клеток стафилококков, их диаметр становился достоверно меньше в обоих вариантах (табл. 1). После часовой обработки биоплёнок антисептиками появляются участки разрыхления, более выраженные после контакта с Пронтосаном®, одним из компонентов которого является поверхностно-активное вещество, разрушающее биоплёночную структуру, обуславливая неравномерное распределение матрикса. Действительно, показатель S_q , характеризующий поверхность биоплёнки, образованной бактериями *S.aureus* на стекле, увеличивался в 1,4 и 3,5 раза после экспозиции с хлоргексидином (ХГ) и Пронтосаном® (ПР) соответственно (табл. 1), что отразилось и на толщине биоплёнки, которая статистически значимо уменьшалась (табл. 2). При оценке жизнеспособности

клеток с помощью КЛСМ выявлено, что бактерии в контрольной биоплёнке в основном живые, но после контакта с антисептиками большинство их становилось повреждёнными.

При выбранных условиях бактерии *P.aeruginosa* непрерывный монослой на стекле не формировали. На АСМ-изображении видны «многоклеточные островки», форма клеток чёткая, округлая, определяются жгутики, и большинство клеток в биоплёнке жизнеспособные (см. рисунок и табл. 2). После воздействия антисептиков бактерии располагались попарно или одиночно, морфологические параметры микробных клеток претерпевали существенные изменения: жгутики не визуализировались, клетки становились достоверно короче и толще — округлялись (табл. 1). Жизнеспособные клетки в биоплёнке практически не встречались. Шероховатость клеточной поверхности псевдомонадной биоплёнки после контакта с хлоргексидином и Пронтосаном® увеличивалась в 1,2 и 1,5 раза соответственно.

АСМ-изображение биоплёнки, сформированной при совместном росте двух штаммов бактерий, свидетельствует о том, что в её состав входят обе культуры, но преобладающий вид, кокковая или палочковидная микробиота, оценить не представлялось возможным из-за изменения морфологических параметров клеток (см. рисунок и табл. 1). Так, для палочковидных бактерий выявлена тенденция к укорочению и утолщению, для кокков — увеличение в диаметре, хотя изменения размеров



АСМ-изображение 20-часовой биоплёнки, образованной на стекле штаммами *S.aureus* и *P.aeruginosa* в моно- и микстварианте.

К – контроль (ФБС); ХГ – хлоргексидин; ПР – Пронтосан®.

клеток статистически не значимы. Структура биоплёнки разряженная, монослой не формируется, тем не менее выявляются многоклеточные скопления бактерий. После часовой обработки смешанной биоплёнки растворами антисептиков отдельные скопления бактерий на поверхности стекла сохраняются. При количественном подсчёте клеток после получения КЛСМ-изображений обнаружено снижение как общего числа бактерий, так и жизнеспособных клеток (см. табл. 2). При этом их диаметр достоверно уменьшался в варианте с Пронтосаном®, а типичные палочковидные клетки визуализировать не удалось. Показатель шероховатости поверхности полимикробной биоплёнки в большей степени увеличивался после контакта с Пронтосаном®, что было выявлено и для моновиовых культур. Необходимо отметить, что и в бинарном, и в моновиовых вариантах при КЛСМ-сканировании толщина

биоплёнки снижалась после обработки обоими антисептиками.

По результатам исследования влияния антисептиков на биоплёнки, сформированные референтными штаммами *S.aureus* и *P.aeruginosa* на гидрофобной поверхности в лунках полистиролового планшета, показано, что после воздействия Пронтосана® биомасса моновиовых биоплёнок уменьшалась в 1,9 и 7,4 раза соответственно, а смешанной биоплёнки — в 5,2 раза (табл. 3). Ни в одном из вариантов не выявлено снижения этого показателя после обработки хлоргексидином. При оценке жизнеспособности клеток в моновиовых биоплёнках обнаружено, что число КОЕ в контроле составило $9,25E+06 \pm 1,12E+06$ и $2,13E+07 \pm 0,53E+07$ для *S.aureus* и *P.aeruginosa* соответственно. После экспозиции биоплёнок с хлоргексидином количество жизнеспособных клеток для обоих видов

Таблица 3. Толщина и количество клеток в биоплёнках, образованных на поверхности полистирола смешанной и моновидовыми культурами *S.aureus* и *P.aeruginosa*

Вариант	Биомасса биоплёнки, Ед, ОП ₅₈₀ ¹	Количество клеток, КОЕ/мл
<i>S.aureus</i>	0,232±0,049	9,25E+06 ± 1,12E+06
<i>S.aureus</i> +ХГ	0,213±0,045	2,60E+03 ± 0,78E+03*
<i>S.aureus</i> +ПП	0,123±0,068*,**	0*,**
<i>P.aeruginosa</i>	0,547±0,066 [#]	2,13E+07 ± 0,53E+07 [#]
<i>P.aeruginosa</i> +ХГ	0,475±0,126 [#]	2,67E+04 ± 0,36E+04*, [#]
<i>P.aeruginosa</i> +ПП	0,077±0,014*,**, [#]	0*,**
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	0,458±0,051 [#]	S.a 1,70E+06 ± 0,27E+06 P.a 1,45E+07 ± 0,45E+07 [#]
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ХГ	0,518±0,081	S.a 2,00E+03 ± 1,76E+03 P.a 2,13E+04 ± 0,74E+04*
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i> +ПП	0,088±0,012*,**	0*,**

Примечание. ¹ — определяли спектрофотометрическим методом по элюированию 0,1% генцианвиолета; * — различия статистически значимы при сравнении с контролем в соответствующем варианте (без обработки антисептиком); ** — различия статистически значимы при сравнении с ХГ; [#] — различия статистически значимы при сравнении с *S.aureus* в аналогичных условиях (при $p \leq 0,05$).

бактерий снизилось на три порядка, а при воздействии Пронтосана® их не было выявлено ни в одном варианте. Данные, полученные для смешанной культуры, позволили констатировать, что в составе биоплёнки присутствовали обе культуры бактерий и клетки их оставались жизнеспособными (росли на желточно-солевом и цетримидном агарах). Аналогично моновидовым вариантам Пронтосан® полностью подавлял способность бактерий к росту на агаризованных селективных средах, тогда как при экспозиции с хлоргексидином в биоплёнках сохранялись жизнеспособные клетки обоих штаммов.

Обсуждение результатов

Бактерии *S.aureus* и *P.aeruginosa* являются сильными антагонистами, тем не менее ассоциации данных видов часто встречаются при муковисцидозе, осложнённом инфекционным процессом [15—17], и в раневом отделяемом больных ожоговых и реанимационных отделений [12, 18]. В многочисленных работах показан выраженный антибактериальный эффект хлоргексидина и полигексанида, а также препаратов на его основе, таких как Пронтосан®, в исследованиях *in vivo* [19—21]. Изучение влияния различных антибактериальных веществ на биоплёнки *in vitro* позволяет проводить качественный и количественный анализ с различными моновидовыми и смешанными культурами, сравнивать несколько препаратов между собой, определять механизмы их действия. Использование АСМ и КЛСМ при решении вопросов, связанных с характеристикой/оценкой морфологических особенностей бактериальных клеток при воздействии различных факторов, в том числе в составе биоплёнок, является актуальным направлением развития современных методов микробиологического анализа [22—25].

Проведённое исследование позволило получить новую информацию о влиянии хлоргексиди-

на и Пронтосана® на биоплёнки, образованные референтными штаммами *S.aureus* и *P.aeruginosa*, в том числе в смешанном сообществе. Показано изменение структурной организации бактериальных биоплёнок и морфологии сессильных клеток (кокки становились меньше по диаметру, а палочки укорачивались) после воздействия антисептических препаратов. Достоверное изменение линейных размеров клеток сопровождалось увеличением шероховатости их поверхности, более выраженное для Пронтосана®. Интересно, что под действием биоцидов на основе алкилдиметилбензиламмония хлорида и полигексаметиленгуанидина морфоструктурные изменения бактерий *P.aeruginosa* несколько отличались от выявленных нами: И. А. Гавриловой и соавт. показано, что увеличение поперечных размеров клеток синегнойной палочки сопровождалось увеличением и их длины [26]. Авторы объясняют этот феномен утратой бактериями формообразующих свойств под действием биоцида.

Бактерицидный эффект хлоргексидина при выбранных в данном исследовании условиях (на стекле, полистироле) проявлялся в отношении как *S.aureus*, так и *P.aeruginosa*. Механизм действия хлоргексидина двойной: в низких (антисептических) концентрациях он способен изменять структуру фосфолипидной мембраны, вследствие чего нарушается её целостность, возникает смещение осмотического равновесия и гибель клетки; в высоких концентрациях (как дезинфектант) хлоргексидин вызывает «затвердевание» цитоплазмы — осаждение белков и нуклеиновых кислот [27]. Полигексанид принадлежит к той же группе, что и хлоргексидин, но отличается отсутствием двух фрагментов *n*-хлоранилина и количеством активных участков в молекуле, а этот параметр играет важную роль в антимикробной активности антисептика [28]. Более выраженный эффект Пронтосана® на количество клеток в би-

оплётке и их жизнеспособность связан с действием амидопропил-бетаина, приводящего к её «разрыхлению», уменьшению количества внеклеточного матрикса, что увеличивает доступность антибактериального компонента к клеткам внутренних слоев биоплёнки. Это объясняет различия в бактерицидном действии антисептиков: Пронтосан® полностью подавлял жизнеспособность клеток в смешанной и моновиовых биоплёнках, образованных как на гидрофильной (за исключением одного варианта), так и гидрофобной абиотических поверхностях.

Тот факт, что не все клетки в составе биоплёнки погибают после воздействия на неё антибактериальных веществ, установлен рядом исследователей. Так, в работе К. Smith и I. S. Hunter показано, что до 11% бактерий *S.aureus* (на дисках из нержавеющей стали) и до 80% клеток *P.aeruginosa* (на тефлоновых и полиэтиленовых дисках) оставались в биоплёнках жизнеспособными после воздействия раствора хлоргексидина, который использовали в дезинфицирующей концентрации [29]. Р. С. Bonez и соавт., протестировав активность хлоргексидина в отношении планктонных и сессильных клеток различных видов бактерий, также констатировали меньшую эффективность антисептика на биоплёночный фенотип *P.aeruginosa* и *S.aureus* (наряду с *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii*) [30]. Выявленная устойчивость клеток к антисептикам может быть связана с фильтрующей способностью матрикса, заполняющего межклеточное пространство и затрудняющего доставку средства во внутренние слои биоплёнки [31]. У *P.aeruginosa* механизмы устойчивости могут быть опосредованы также изменением структуры липополисахаридного слоя, что ограничивает внедрение биоцидов, или активным выведением антибиотика (эффлюксом), осуществляемым за счёт гиперэкспрессии мембранной MexCD-OprJ помпы [32, 33].

Выживаемость бактерий под влиянием антибиотиков и антисептиков определяет эффективность терапии при инфекционных осложнениях. Поэтому исследования, связанные с оценкой жизнеспособности клеток в биоплёнках, широко проводятся в бактериологических лабораториях различных стран, а используемые методы разнообразны, но не всегда стандартизованы [34]. Для определения чувствительности сессильных культур к антибиотикам предложен показатель «минимальная биоплёнко-элиминирующая концентрация» (МБЭК), характеризующий полную гибель бактерий, образующих биоплёнку [35]. Методика выявления жизнеспособности клеток в составе биоплёнок с помощью КЛСМ краткосрочна, но требует дорогостоящего оборудования, а увеличение экспозиции препарата с красителем может сместить равновесие в сторону нежизнеспособ-

ных бактерий. Кроме того, универсальность и надёжность пропидия йодида, широко используемого в подобных исследованиях, в последнее время подвергается сомнению [36]. В нашей работе гетерогенность морфологических свойств клеток обоих видов, сформированная под влиянием антисептиков, не позволила выявить доминирующую культуру и жизнеспособность клеток в смешанной биоплёнке с помощью АСМ и КЛСМ. При применении метода прямого посева бактериальной суспензии на селективные среды после ультразвуковой обработки модельной бинарной биоплёнки было установлено, что в её составе присутствуют жизнеспособные бактерии обоих видов с некоторым преимуществом *P.aeruginosa*, которое сохраняется и после экспозиции с хлоргексидином.

Известно, что в биоплёнках конкуренция между различными видами микроорганизмов обнаруживается крайне редко из-за низкой метаболической активности клеток, в том числе из-за снижения влияния антибактериальных веществ, и в большинстве случаев жизнеспособность сохраняют все виды [37–39]. Бактерии *S.aureus* и *P.aeruginosa*, колонизирующие лёгкие, вынуждены вступать в ассоциативное взаимодействие, что обуславливает их защиту от влияния факторов макроорганизма [16]. L.Yang и соавт. показали, что дикий тип *P.aeruginosa* PAO1 облегчает формирование микроколоний *S.aureus* при совместном культивировании и защищает *S.aureus* от фагоцитоза *Dictyostelium discoideum* в биоплёнке [17].

В лунках полистиролового планшета биомасса биоплёнки, образованной штаммом *P.aeruginosa*, была существенно выше, чем у *S.aureus*, и сравнима с биомассой полимикробной биоплёнки. Необходимо подчеркнуть, что количество входящих в моновиовые биоплёнки клеток было сопоставимо между культурами, но в бинарной — число бактерий *P.aeruginosa* было на порядок выше. Массивность псевдомонадной биоплёнки, по-видимому, обуславливал высокий уровень матриксного компонента в её составе. Подобное предположение подтверждается и анализом толщины образованной на стекле биоплёнки с помощью комбинированной системы микроскопирования, когда при сканировании поверхности выявлено существенное различие показателя — 200 нм для *P.aeruginosa* против 100 нм для *S.aureus* (данные не представлены), которое отсутствует при послойном сканировании. Массивность биоплёнки, сформированной на гидрофобной поверхности, во всех вариантах статистически значимо уменьшалась только при действии Пронтосана®. Ранее в исследовании на клинических изолятах также показано уменьшение биомассы моновиовых биоплёнок для обеих культур в 75% случаях и в 100% — для биоплёнок

из ассоциации бактерий *P.aeruginosa* и *S.aureus*. Хлоргексидин не оказывал подобного эффекта в отношении клинических изолятов *P.aeruginosa*, тем не менее выявлено снижение биомассы моновидовой биоплёнки у трети штаммов *S.aureus* [40]. Для некоторых культур показано, что экспозиция с хлоргексидином приводила к увеличению этого показателя. Данный феномен может быть связан с тем, что под действием антисептика происходит лизис поверхностных клеток, содержимое которых (протеазы, лиазы, ДНК-азы) «разрыхляет» биоплёнку, что способствует проникновению и удержанию красителя, обеспечивая ложное увеличение показателя биомассы биоплёнки при данном методе оценки.

Заключение

Инфекции, ассоциированные с образованием биоплёнки, могут быть результатом колонизации биотопов организма хозяина как моновидовой, так и смешанной культурой бактерий. Межвидовые взаимоотношения различных микроорганизмов в биоплёнках, в том числе механизмы устойчивости сложных мультивидовых сообществ к действию антимикробных веществ, до конца не объяснены. Совершенствование техники микроскопирования и комплексное применение КЛСМ и АСМ позволяют с большей эффективностью изучать феномен биоплёнокообразования бактерий, а именно оценивать жизнеспособность клеток, особенности структуры поверхности, архитектонику, клеточный и матриксный компоненты биоплёнки.

Полученные в работе данные показали негативное влияние двух наиболее часто применяемых в хирургической практике антисептиков на sessильные формы бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa* в

смешанном и моновидовых вариантах. Применение АСМ при изучении бактериальных биоплёнок позволило оценить их фенотипические изменения под действием антисептических препаратов, а именно варибельность морфологии клеток бактерий и структурных изменений клеточной поверхности. В результате воздействия биоцидов клетки становились меньше по размеру или округлялись, шероховатость поверхности увеличивалась. Дезорганизация поверхностных клеточных структур происходила под влиянием обоих антисептиков, но при воздействии Пронтосана® показатель шероховатости увеличивался более значимо. Сходные данные показаны и при оценке жизнеспособности бактерий: использование Пронтосана® дало лучший антибактериальный эффект в отношении sessильных клеток двух основных возбудителей раневых инфекций.

Понятно, что в естественных условиях и искусственных системах «поведение» бактериальных биоплёнок, в том числе в контексте эффективности антибактериальных и антисептических препаратов, может существенно различаться. Тем не менее изучение влияния биоцидов на клеточный и матриксный компоненты бактериальных биоплёнок *in vitro* важно с точки зрения понимания механизмов, способствующих их разрушению/удалению, и выработки новых методов лечения инфекционных заболеваний, ассоциированных с биоплёнками.

Авторы выражают благодарность чл.-корр. РАН, д.б.н., профессору, зав. лабораторией ЛАМ ИЭГМ УрО РАН И. Б. Ившиной и сотрудникам лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета к.б.н. Е. В. Рубцовой и аспиранту И. О. Коршуновой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биоплёнки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина. Журн микробиол эпидемиол и иммунобиол 2011; 3: 99—109. / Romanova Ju.M., Gincburg A.L. Bakterial'nye bioplenki kak estestvennaja forma sushhestvovaniya bakterij v okruzhajushhej srede i v organizme hozjaina. Zhurn mikrobiol jepidemiol i immunobiol 2011; 3: 99—109. [in Russian]
2. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции. Журн инфектол 2010; 2: 3: 4—15. / Gostev V.V., Sidorenko S.V. Bakterial'nye bioplenki i infekcii. Zhurn infektol 2010; 2: 3: 4—15. [in Russian]
3. Costerton W., Veeh R., Shirtliff M., Pasmore M., Post C., Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J Clin Invest 2003; 112: 1466—1477.
4. Mengi S., Vohra P., Sawhney N., Singh V.A. Biofilms: a diagnostic challenge in persistent infections. Int J of Research in Medical and Health Sciences 2013; 2: 3: 22—27.
5. Hoiby N., Ciofu O., Johansen H.K., Song Z.J., Moser C., Jensen P.O. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. Int J Oral Sci 2011; 3: 2: 55—65.
6. Stewart P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol 2002; 292: 107—113.
7. Гаврилова И.А., Титов Л.П. Оценка влияния суббиоцидных доз полигуанидина на морфометрические параметры колоний и бактериальных клеток *Pseudomonas aeruginosa* методом атомно-силовой микроскопии. Современные проблемы инф патологии человека: сборник научных трудов / Под ред. проф. Г.М. Игнатова. 2011; 4: 244—249. / Gavrilova I.A., Titov L.P. Ocenka vlijaniya subbioicidnyh doz poliguanidina na morfometricheskie parametry kolonij i bakterial'nyh kletok *Pseudomonas aeruginosa* metodom atomno-silovoj mikroskopii. Sovremennye problemy inf patologii cheloveka: sbornik nauchnyh trudov / Pod red. prof. G.M. Ignat'eva. 2011; 4: 244—249. [in Russian]
8. Зверьков А.В., Зузова А.П. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков. Клин микробиол и антимикроб химиотер 2013; 15: 4: 279—285. / Zver'kov A.V., Zuzova A.P. Hlorgeksidin: proshloe, nastojashhee i budushhee odnogo iz osnovnyh antiseptikov. Klin mikrobiol i antimikrob himioter 2013; 15: 4: 279—285. [in Russian]
9. Бережанский Б.В., Жевнерев А.А. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока. Клин микробиол антимикроб химиотер 2006; 8: 2: 130—144. / Berezhanskij B.V., Zhevnerov A.A. Kateter-associirovannye infekcii krovotoka. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2006; 8: 2: 130—144. [in Russian]
10. Божикова С.А., Краснова М.В., Полякова Е.М., Рукина А.Н., Шабанова В.В. Способность к формированию биоплёнок у клинических штаммов *S.aureus* и *S.epidermidis* — ведущих возбудителей ортопедической имплант-ассоциированной инфекции. Клин микробиол антимикроб химиотер 2014; 16: 2: 149—156. / Bozhkova S.A., Krasnova M.V., Poljakova E.M., Rukina A.N., Shabanova V.V. Sposobnost' k formirovaniyu biopljonok u klinicheskijh shtammov *S.aureus* i *S.epidermidis* — vedushhih vozбудitelej ortopedicheskoj implant-associirovannoj infekcii. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2014; 16: 2: 149—156. [in Russian]
11. Гординская Н.А., Сабирова Е.В., Абрамова Н.В., Дударева Е.В., Скленова Е.Ю., Некаева Е.С. Фенотипические и молекулярно-генетические особенности возбудителей раневой ожоговой инфекции.

- Клин микробиол антимикроб химиотер 2012; 14: 4: 342—346. / Gordinskaja N.A., Sabirova E.V., Abramova N.V., Dudareva E.V., Skleenova E.Ju., Nekaeva E.S. Fenotipicheskie i molekularno-geneticheskie osobennosti vozбудitel'nyh ranevoj ozhogovoj infekcii. Klin mikirobiol antimiokrob himioter 2012; 14: 4: 342—346. [in Russian]
12. Шипицына И.В., Осипова Е.В. Биоплёнокообразующая способность выделенных из ран больных хроническим остеомиелитом штаммов *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* и их ассоциаций, полученных *in vitro*. Успехи современного естествознания 2014; 11: 18—21. / Shipitsyna I.V., Osipova E.V. Bioplenkoobrazujushhaja sposobnost' vydelennyh iz ran bol'nyh hronicheskim osteomielitom shtammov *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* i ih associacij, poluchennyh *in vitro*. Uspеhi sovremennogo estestvoznaniya 2014; 11: 18—21. [in Russian]
 13. Mulcahy L.R., Isabella V.M., Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. Microb Ecol 2013; 6: 76—79.
 14. O'Toole G.F., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol 1998; 30: 295—304.
 15. Васильева Т.Г., Шишацкая С.Н., Павлова Я.Е. Некоторые аспекты поражения органов дыхания и желудочно-кишечного тракта при муковисцидозе у детей. X Нац. конгресс «Муковисцидоз у детей и взрослых» 2011; 91—97. / Vasil'eva T.G., Shishackaja S.N., Pavlova Ja.E. Nekotorye aspekty porazheniya organov dyhanija i zheludochno-kishechnogo trakta pri mukoviscidoze u detej. H Nac. kongress «Mukoviscidoz u detej i vzroslyh» 2011; 91—97. [in Russian]
 16. Fugère A., Lalonde Séguin D., Mitchell G., Déziel E., Dekimpe V., Cantin A.M. et al. Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. PLoS One 2014; 23: 9 (1):e86705.
 17. Yang L., Liu Y., Markussen T., Hoiby N., Tolker-Nielsen T., Molin S. Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Immunol Med Microbiol 2011; 62: 339—347.
 18. Бондаренко Е.В., Лана Т.М., Сергеева Л.Г., Деметьева Л.М. Анализ распространённости инфекций, вызванных синегнойной палочкой, в хирургических отделениях БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1. Инфекция и иммунитет 2012; 2: 1: 2: 473—474. / Bondarenko E.V., Lapa T.M., Sergeeva L.G., Dement'eva L.M. Analiz rasprostranennosti infekcij, vyzvannyh sinegnojnoj palochkoj, v hirurgicheskikh otdelenijah BUZ VO «Voronezhskaja oblastnaja klinicheskaja bol'nica № 1. Infekcija i immunitet 2012; 2: 1: 2: 473—474. [in Russian]
 19. Алексеев А.А., Бобровников А.Э., Крутиков М.Г., Тусинова С.А., Кашин Ю.Д., Лагвилава М.Г. Опыт применения полигексанида для местного лечения инфицированных ожоговых ран. Consilium med Хирургия 2006; 1: 55—58. / Alekseev A.A., Bobrovnikov A.E., Krutikov M.G., Tusinova S.A., Kashin Ju.D., Lagvilava M.G. Opyt primeneniya poligeksanida dlja mestnogo lechenija inficirovannyh ozhogovyh ran. Consilium med Hirurgija 2006; 1: 55—58. [in Russian]
 20. Харитонов Ю.М., Фролов И.С. Новые технологии в лечении больных одонтогенной гнойной инфекцией. Фундаментальные исследования 2014; 7: 582—584. / Haritonov Ju.M., Frolov I.S. Novye tehnologii v lechenii bol'nyh odontogennoj gnojnoj infekciej. Fundamental'nye issledovanija 2014; 7: 582—584. [in Russian]
 21. Чмырёв И.В., Скворцов Ю.Р., Кичемасов С.Х. Использование Пронтосана после поздней некрэктомии при глубоких ожогах. Вестник национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова 2010; 5: 2: 49—54. / Chmyr'ov I.V., Skvorcov Ju.R., Kichemasov S.H. Ispol'zovanie Prontosana posle pozdnej nekrjektomii pri glubokih ozhogah. Vestnik nacional'nogo mediko-hirurgicheskogo Centra im. N.I. Pirogova 2010; 5: 2: 49—54. [in Russian]
 22. Дерябин Д.Г., Васильченко А.С., Никитин А.Н. Исследование воздействия ампициллина на морфологические и механические свойства клеток *Escherichia coli* и *Bacillus cereus* с использованием метода атомно-силовой микроскопии. Антибиотики и химиотер 2011; 7: 8: 7—12. / Derjabin D.G., Vasil'chenko A.S., Nikijan A.N. Issledovanie vozdejstvija ampicillina na morfologicheskie i mehanicheskie svojstva kletok *Escherichia coli* i *Bacillus cereus* s ispol'zovaniem metoda atomnosilovoj mikroskopii. Antibiotiki i himioter 2011; 7: 8: 7—12. [in Russian]
 23. Ерохин П.С. Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы. Автореф. дисс. к. физ.-мат. н. Саратов. 2015; 23. / Erohin P.S. Atomno-silovaja mikroskopija kak instrument opredelenija chuvstvitel'nosti bakterij k faktoram bioticheskoj i abioticheskoj prirody. Avtoref. diss. k. fiz.-mat. n. Saratov. 2015; 23. [in Russian]
 24. Pamp S.J., Sternberg C., Tolker-Nielsen T. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. Cytometry A 2009; 75: 2: 90—103.
 25. Wright C.J., Shah M.K., Powell L.C., Armstrong I. Application of AFM from microbial cell to biofilm. Scanning 2010; 32: 3: 134—149.
 26. Гаврилова И.А., Жавнерко Г.К., Тумов Л.П. Атомно-силовая микроскопия морфоструктурных изменений *Pseudomonas aeruginosa*, подвергшихся воздействию биоцида на основе алкилдиметилбензилламмония хлорида и полигексаметиленгуанидина. Доклады нац ак наук Беларуси 2013; 5: 81—87.
 27. Шайхутдинова А.Р. Механизмы модуляции работы рецепторно-канального комплекса хлоргексидином. Доклады академии наук 2005; 402: 427—429.
 28. Hübner N.O., Kramer A. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. Skin Pharmacol Physiol 2010; 23: 17—27.
 29. Smith K., Hunter I.S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. J Med Microbiol 2008; 57: 8: 966—973.
 30. Bonez P.C., Dos Santos Alves C.F., Dalmolin T.V., Agertt V.A., Mizdal C.R., Flores Vda C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. Am J Infect Control 2013; 41: 12: 119—122.
 31. Singh R., Ray P., Das A. et al. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1955—1958.
 32. Barah F. Non-antibiotic biocides: an updated review. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. (A. Méndez-Vilas, Ed.) Badajoz, Spain, Formatex Research Centre 2013; 598—607.
 33. Chiang W.C., Pamp S.J., Nilsson M., Givskov M., Tolker-Nielsen T. The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. FEMS Immunol Med Microbiol 2012; 65: 245—256.
 34. Чеботарь И.В., Маянский Н.А., Кончакова Е.Д. Новый метод исследования антибиотикорезистентности бактериальных биоплёнок. Клин микробиол антимикроб химиотер 2012; 14: 4: 303—308. / Chebotar' I.V., Majanskij N.A., Konchakova E.D. Novyj metod issledovanija antibiotikorezistentnosti bakterial'nyh biopljonok. Klin mikirobiol antimiokrob himioter 2012; 14: 4: 303—308. [in Russian]
 35. Sepandj F., Ceri H., Gibb A., Read R., Olson M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. Perit Dial Int 2004; 24: 1: 65—67.
 36. Shi L., Günther S., Hübschmann T., Wick L.Y., Harms H., Müller S. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. Cytometry A 2007; 71: 8: 592—598.
 37. Маянский Н.А., Чеботарь И.В., Евтеева Н.И., Руднева Е.И. Межвидовое общение бактерий и образование смешанной (полимикробной) биоплёнки. Журн микробиол эпидемиол и иммунобиол 2012; 1: 93—101. / Majanskij N.A., Chebotar' I.V., Evtееva N.I., Rudneva E.I. Mezvidovoe obshhenie bakterij i obrazovanie smeshannoj (polimikrobnnoj) biopljonki. Zhurn mikirobiol jepidemiol i immuno-biol 2012; 1: 93—101. [in Russian]
 38. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биоплёнка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма. Микробиол 2007; 76: 2: 149—163. / Nikolaev Ju.A., Plakunov V.K. Bioplenka — «gorod mikrobov» ili analog mnogokletochnogo organizma. Mikrobiol 2007; 76: 2: 149—163. [in Russian]
 39. Mogilnaya O.A., Lobova T.I., Kargatova T.V., Popova L.Y. Biofilm formation by bacterial associations under various salinities and cooper ion stress. Biofoulin 2005; 21: 5: 6: 247—255.
 40. Еньчева Ю.А., Колоколова А.А., Кузнецова М.В. Действие антисептиков на биоплёнки клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в монокультуре и в ассоциации с *Staphylococcus aureus*. Российский иммунол журн 2015; 9: 18: 2: 1: 637—639. / En'cheva Ju.A., Kolokolova A.A., Kuznecova M.V. Dejstvie antiseptikov na bioplenki klinicheskikh shtammov *Pseudomonas aeruginosa* v monokul'ture i v associacii s *Staphylococcus aureus*. Rossijskij immunol zhurn 2015; 9: 18: 2: 1: 637—639. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузнецова Марина Валентиновна — д. м. н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ИЭГМ УРО РАН, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО «ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера» Минздрава РФ. E-mail: mar@iegm.ru

Еньчева Юлия Абыталиновна — заочный аспирант кафедры общей хирургии №1 ГБОУ ВПО «ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера» Минздрава РФ, врач-хирург ожогового отделения ГАУЗ ПК «ГКБ №21»

Самарцев Владимир Аркадьевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии №1 ГБОУ ВПО «ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера» Минздрава РФ

Антимикробные свойства антибиотика эремоксиларина А, образуемого аскомицетным грибом из класса *Sordariomycetes* в условиях глубинного культивирования

О. В. ЕФРЕМЕНКОВА¹, Б. Ф. ВАСИЛЬЕВА¹, В. А. ЗЕНКОВА¹, А. М. КОРОЛЕВ¹,
Ю. Н. ЛУЗИКОВ¹, Т. А. ЕФИМЕНКО¹, И. А. МАЛАНИЧЕВА¹, Е. П. МИРЧИНК¹,
Е. Б. ИСАКОВА¹, Е. Н. БИЛАНЕНКО², О. В. КАМЗОЛКИНА²

¹ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

Antimicrobial Properties of Eremoxylarin A Produced by Ascomycete of *Sordariomycetes* in Submerged Culture

O. V. EFREMENKOVA, B. F. VASILJEVA, V. A. ZENKOVA, A. M. KOROLEV, Y. N. LUSIKOV, T. A. EFIMENKO,
I. A. MALANICHEVA, E. P. MIRCHINK, E. B. ISAKOVA, E. N. BILANENKO, O. V. KAMZOLKINA

Gause Institute of Antibiotics, Moscow

Lomonosov Moscow State University, Moscow

Из природной среды выделен грибной штамм ИНА 01108, продуцирующий вещество, обладающее широким спектром антибактериальной активности. На основании морфологических признаков и анализа ДНК установлено, что штамм ИНА 01108 принадлежит к аскомицетам класса *Sordariomycetes*. В условиях глубинного культивирования этот штамм образует не менее четырех антибиотиков, из которых основной компонент был идентифицирован как сесквитерпен эремофиланового типа эремоксиларин А. Эремоксиларин А *in vitro* эффективен в отношении грамположительных тест-бактерий, включая метициллинорезистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) и тест-штамм *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177, устойчивый к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина. На модели стафилококкового сепсиса мышей определяли эффективность и токсичность эремоксиларина А. Доза 6,25 мг/кг сопровождается 100% излечением и выживаемостью животных, однако доза 3,12 мг/кг близка к ЕД₅₀. Химическая структура эремоксиларина А позволяет модифицировать данный антибиотик; проведение таких исследований может быть целесообразным для получения менее токсичного производного, не утратившего ценных антимикробных свойств.

Ключевые слова: эремоксиларин А, *Sordariomycetes*, бактерии, лекарственная устойчивость, MRSA, *Leuconostoc mesenteroides*.

The fungal strain INA 01108 producing antibiotic substances with broad spectrum of antibacterial activity was isolated from the natural environment. By the morphological characteristics and DNA analysis it was shown to belong to Ascomycetes of *Sordariomycetes*. In submerged culture the strain produced at least four antibiotics. The major component of them was identified as eremophilane-type sesquiterpene eremoxylarin A. Eremoxylarin A is effective *in vitro* against grampositive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin group glycopeptide antibiotics resistant *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177. The efficacy and toxicity of eremoxylarin A was determined on a murine staphylococcal sepsis model. The dose of 6.25 mg/kg provided 100% recovery and survival of the animals, while the dose of 3.12 mg/kg was close to the ED₅₀. The chemical structure of eremoxylarin A allows to modify the antibiotic and such studies may be relevant to design a less toxic derivative without loss of the valuable antimicrobial properties.

Key words: eremoxylarin A, *Sordariomycetes*, bacteria, drug resistance, MRSA, *Leuconostoc mesenteroides*.

Эремоксиларин А относится к природным сесквитерпенам эремофиланового типа [1]. Соединения этой группы описаны преимущественно у растений, они содержатся в составе эфирных масел, живиц, скипидаров и зачастую обуславливают характерный для растения запах. Особенно богаты сесквитерпенами хвойные и

цветковые растения, но также они встречаются у грибов и насекомых. Для медицины представляет интерес эффективность ряда сесквитерпенов в отношении простейших, гельминтов, насекомых, бактерий, в том числе микобактерий, а также в отношении злокачественных новообразований [2—11].

Антибиотики эремоксиларин А и В впервые описаны в Японии в 2005 г. как продукты аскомицетного плесневого гриба из рода *Xylaria* — эндофита растения [11]. Помимо антибактери-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 119021, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11. НИИНА им. Г.Ф.Гаузе

Таблица 1. ЯМР-спектры антибиотика эремоксиларина А

№ атома	Сдвиги протонов (м.д.)	Сдвиги атомов углерода (м.д.)	№ атома	Сдвиги протонов	Сдвиги атомов углерода
1	5,49, 1H, CH(д)	73,68	21		116,14
2	1,75; 2,06; 2H, CH ₂ (т)	30,42	21a	5,79, 1H, CH(д)	
3	1,74; 2,25; 2H, CH ₂ (т)	21,02	22		151,17
4	2,40, 1H, CH(д)	53,89	22a	7,28, 1H, CH(д)	
5		38,91	23		132,30
6	2,02; 2,27; 2H, CH ₂ (т)	44,00	23a	1,54, 3H, CH ₃ (квт)	12,30
7	3,70, 1H, CH(д)	44,15	24		149,74
8		197,73	24a	5,70, 1H, CH(д)	
9	6,0, 1H, CH(д)	130,05	25	2,68, 1H, CH(д)	31,63
10		160,39	26	1,13; 1,33; 2H, CH ₂ (т)	45,19
12		166,47	27	1,23, 1H, CH(д)	33,16
14		174,66	28	1,11; 1,28; 2H, CH ₂ (т)	30,81
16	1,46, 3H, CH ₃ (квт)	19,70	29	0,83, 3H, CH ₃ (квт)	11,48
17		149,61	31a,31b	6,22; 6,32; 2H, CH ₂ (т)	136,45
18		194,07	32	0,98, 3H, CH ₃ (квт)	21,29
18a	9,44, 1H, CH(д)		33	0,82, 3H, CH ₃ (квт)	19,24

ального действия показана другая биологическая активность — эремоксиларины А и В ингибируют кальциневрин независимым от иммунофилина образом [12].

Целью исследования было выделение из природной среды продуцентов антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость болезнетворных бактерий. В ходе изыскания описан штамм — продуцент эремоксиларина А и показана его эффективность *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов MRSA (meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

Материал и методы

Штамм гриба был выделен из природной среды и депонирован в Коллекции культур микроорганизмов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА») под номером ИНА 01108.

Для определения антибиотической активности использовали коллекционные тест-штаммы бактерий, приведённые ниже.

Для поверхностного культивирования штамма ИНА 01108 использовали среду с солодовым экстрактом (%): солодовый экстракт Maltex (Финляндия) — 2%, агар — 2%; вода водопроводная. Штамм ИНА 01108 выращивали 14 сут в пробирках на скошенной агаровой среде при температуре 24°C. Полученный посевной материал хранили при температуре +4°C и использовали на протяжении года без снижения продуктивности. Для тест-штаммов использовали модифицированную агаровую среду № 2 Гаузе следующего состава (%): глюкоза — 1, пептон — 0,5, триптон — 0,3, NaCl — 0,5, агар — 2; вода водопроводная; pH 7,2—7,4.

Глубинное культивирование гриба ИНА 01108 проводили на роторной качалке с 200 об/мин при температуре 28°C в колбах Эрленмейера объёмом 750 мл со 150 мл среды в две стадии. На первой стадии использовали следующую среду (%): солодовый экстракт Maltex (Финляндия) — 2, соевая мука — 0,1; вода водопроводная. Засев производили агаровым блоком площадью 1—2 кв. см с ростом штамма ИНА 01108 и выращивали в течение 7 суток. Полученную на первой стадии посевную культуру в количестве 5 об.% переносили в колбы со средой (%): солодовый экстракт — 2; вода водопроводная; и выращивали на второй стадии от 7 до 21 суток.

Антимикробную активность определяли методом диффузии в агар. Об уровне антимикробной активности судили по диаметрам зон задержки роста тест-культур вокруг лунок или дисков.

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) эремоксиларина А определяли с применением выделенного антибиотика с чистотой не менее 99,5%. МПК определяли *in vitro* методом двукратных серийных разведений в диапазоне концентраций 32—0,125 мкг/мл.

Для определения эффективности эремоксиларина А *in vivo* использовали модель стафилококкового сепсиса. Мышей разбивали на 7 групп по 5 особей и инфицировали внутривенно суспензией клеток штамма *Staphylococcus aureus* 10. Через 24 ч мышам в 6 группах вводили эремоксиларин А в дозах от 50 до 1,56 мг/кг при последовательном двукратном уменьшении дозы в указанном диапазоне. Мышам в седьмой контрольной группе антибиотик не вводили.

Структуру мицелия исследовали с использованием светового микроскопа при увеличениях объективов ×40, ×100 (Axioskop 40FL, фотографировали с помощью камеры AxioCam MRc.) и просвечивающего электронного микроскопа «Jeol» (JEM-100B).

Для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии образцы мицелия, полученного на поверхности агаризованного сусли, помещали в 2,5% раствор глутарового альдегида (Merck) на 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 7,2) на 2 ч (при комнатной температуре). После промывки в Na-фосфатном буфере (3 раза по 15 мин) проводили постфиксацию в 1% растворе OsO₄ 1 ч при комнатной температуре. Материал промывали в растворе буфера, обезвоживали и заливали в EPON (Ferak). Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-8800 с использованием алмазных ножей, окрашивали водным раствором уранил-ацетата (30 мин) с последующим докрасиванием по Рейнольдсу (Reynolds, 1963) и микроскопировали.

Анализ нуклеотидной последовательности области D1/D2 региона 26S (LSU) рДНК и внутреннего транскрибируемого района *its1-5.8S-its2* штамма ИНА 01108 проводили путём амплификации ДНК с использованием праймеров ITS1f (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA) и NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG G). Последующее секвенирование осуществляли на генном анализаторе Applied Biosystems 3500 (США). Для сравнения последовательностей использовали материалы базы данных NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

На 14-е сутки двухстадийного культивирования штамма ИНА 01108 для выделения эремоксиларина А мицелий из культуральной жидкости осаждали центрифугированием и экстрагировали ацетоном. Полученный экстракт упаривали в вакууме

Таблица 2. Физико-химические свойства антибиотика эремоксиларина А

Параметры	Значения
Молекулярная масса (изотопная масса) m/z	471,2796 (M+1) ⁺ ; 493,2639 (M+Na) ⁺ ; 509,2372 (M+K) ⁺ ; 469,2603 (M-1) ⁻ ;
Брутто-формула	C ₂₈ H ₃₈ O ₆
UV-VIS спектр (EtOH), λ _{max} , нм	217,0; 269,0;
ВЭЖХ: время выхода (мин), чистота (%), длина волны (нм)	16,44 мин; 92,8%; 265 нм
ТСХ (SiO ₂ , Merck, F254), Rf в системе:	
1) хлороформ—метанол (9:1)	0,34
2) гексан—ацетон (1:1)	0,5
Качественная реакция:	
(1) KMnO ₄	+
(2) 0,5% нингидрин в EtOH	—
Растворимость:	
(1) хорошая	Метанол, этанол, этилацетат, ацетон
(2) плохая	Гексан
ИК-спектр, ν, см ⁻¹	3357, 2958, 2925, 2853, 1793, 1743, 1684, 1621, 1559, 1507, 1489, 1458, 1396, 1339, 1288, 1239, 1157, 1129, 1092, 1050, 984, 918, 845, 725

Таблица 3. Значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) эремоксиларина А в отношении тест-штаммов бактерий

Бактериальные тест-штаммы	МПК, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	1,0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ВКПМ В-4177 (VR)	1,0
<i>Enterococcus faecalis</i> 560 (VR)	>32,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>32,0
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	>32,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	>32,0

досуха при 37°C, остаток растворяли в этаноле и дальнейшую очистку антибиотика проводили на колонках № 1 и № 2, заполненных силикагелем Kieselgel 60 (фирма Merck, США). На колонке № 1 элюцию осуществляли смесью хлороформ—метанол (95:5). Фракции, обладающие антибиотическим действием в отношении тест-штамма *S. aureus* ИНА 0076 (MRSA), упаривали при 37°C досуха, растворяли в этаноле, вносили в колонку № 2 и элюировали последовательно гексаном и смесью гексан—ацетон (8:2). Фракции с антибиотической активностью объединяли и упаривали в вакууме досуха при 37°C. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на алюминиевых пластинках с закреплённым слоем силикагеля F254 толщиной 0,2 мм (Merck). Системы ТСХ указаны в табл. 2.

Аналитическую ВЭЖХ проводили в жидкостном хроматографе Shimadzu M 20 А, детектируемом фотодиодной матрицей. Анализ проводили на колонке Kromasil 100-5 C18 размером 4,6×250 мм с зернением 5 мкм (Akzo Nobel, Швеция). Объём петли инжектора составлял 20 мкл, образцы вводили в концентрации 0,001—0,005 мг/мл. Подвижная фаза состояла из 0,2% HCOONH₄ pH 4,5 (35%) и ацетонитрила (65%). Элюцию проводили в изократическом режиме 35 мин при скорости потока 1 мл/мин.

Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 241. Регистрацию ИК-спектров проводили с использованием ИК-Фурье спектрометра Nicolet-iS10 (детектор DTGS, светодетектор KBr) с приставкой Smart Performer, оснащённый ZnSe кристаллом. Измерение проводили при разрешении 4 см⁻¹; зона спектра 3000 — 650 см⁻¹. Спектры обрабатывали с использованием программы OMNIC — 7.0.

В полученном продукте структуру эремоксиларина А устанавливали методами ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа, UV-VIS и ИК-спектроскопии. Спектры ЯМР ¹H и ¹³C регистрировали на приборе VXR-400 с рабочей частотой 400 МГц. Химические сдвиги измерены в CDCl₃ или CD₃OD с использованием этих растворителей как внутренних стандартов (CDCl₃, δ_H 7.25 м.д., δ_C 77.00 м.д.;

CD₃OD, δ_H 3.32 м.д., δ_C 49.00 м.д.). Масс-спектры высокого разрешения ESI регистрировали на приборе «micrOTOF-Q II» (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение

На агаризованной питательной среде штамм ИНА 01108 растёт быстро, формируя на 5-е сут роста колонии диаметром 5 см. Вегетативный воздушный мицелий белый, войлоковидный, местами имеются скопления темноокрашенных гиф. Экзопигмент отсутствует. Обратная сторона желтоватая. Стромы (начальная телеоморфная стадия) образуются в культуре на 40—50 сут роста, достигают высоты 2 см, цилиндрические в основании, неразветвлённые, постепенно суживающиеся к верху. Незрелая телеоморфная строма представляет собой плотно прилегающие друг к другу гифы ярко-оранжевого цвета, с возрастом темнеющие до тёмно-коричневого цвета, внутренняя часть стромы не окрашена (рис. 1, а). Конидиеносцы (анаморфная стадия) развиваются на поверхности незрелой телеоморфной стромы. Поверхность стромы имеет неровный бугристый вид из-за полушаровидных выпуклых «подушечек», состоящих из плотного слоя дихотомически разветвлённых несколько раз конидиеносцев. Конидиеносцы заканчиваются широкоовальными, иногда почти цилиндрическими конидиогенными клетками, расположенными палисадным слоем по поверхности стромы (рис. 1, в). Конидии образуются холобластически, места их прикреп-

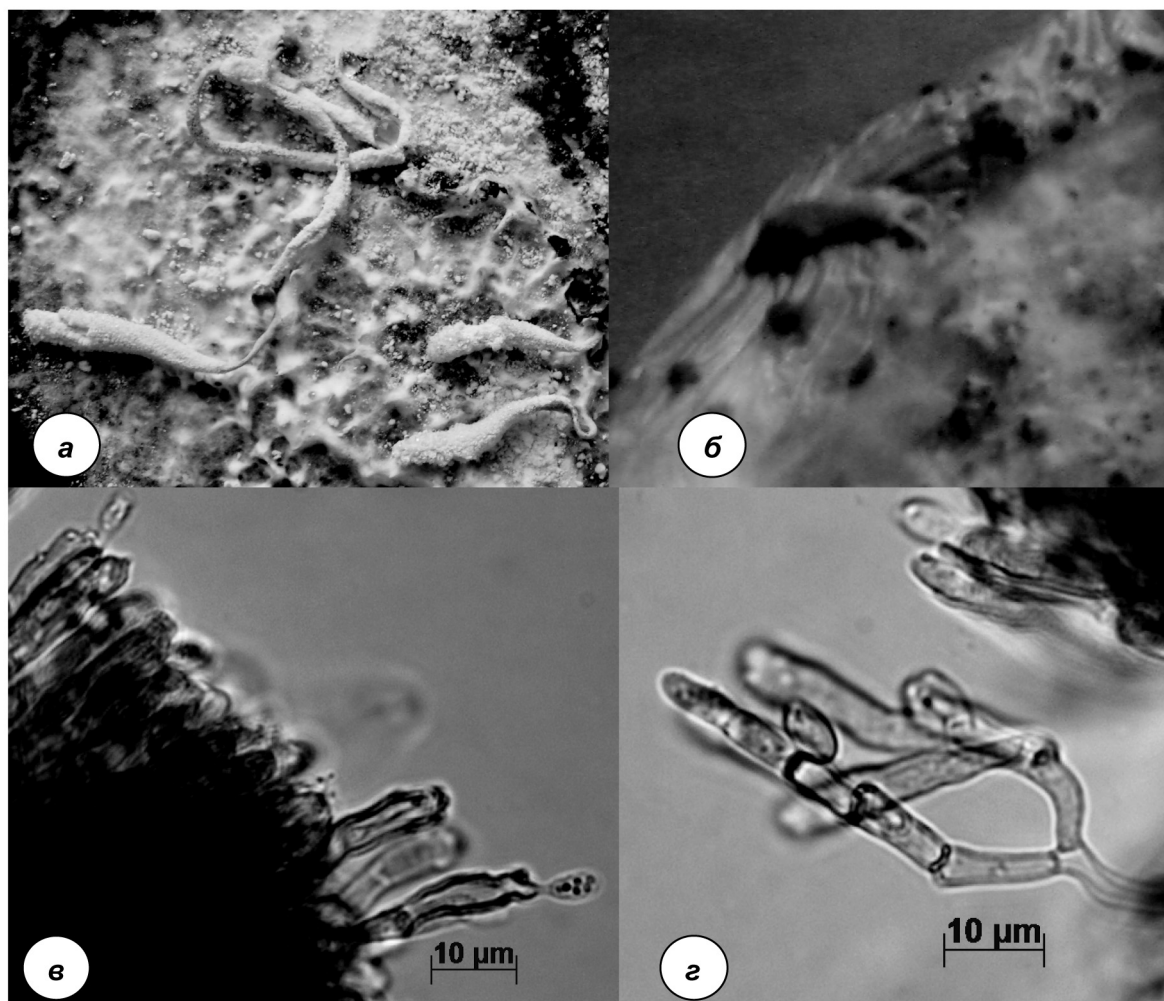


Рис. 1. Штамм гриба ИНА 01108.

а — незрелые телеоморфные стромы на агаризованной питательной среде; б — полушаровидная распростёртая строма в старой культуре; в — палисадный слой конидиогенных клеток; г — дихотомически разветвлённый конидиеносец (световая микроскопия).

Таблица 4. Определение эффективности и токсичности эремоксиларина А на модели стафилококкового сепсиса мышей

Дозы, мг/кг	Дни опыта (в числителе число павших животных, в знаменателе — выживших)									% гибели	% выживших
	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
50	0/5	1/4	1/4	2/3	2/3	3/2	3/2	3/2	3/2	60	40
25	0/5	0/5	0/5	1/4	1/4	2/3	2/3	2/3	2/3	40	60
12,5	0/5	1/4	1/4	1/4	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	40	60
6,25	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0	100
3,12	0/5	0/5	0/5	2/3	2/3	3/2	3/2	3/2	3/2	60	40
1,56	0/5	0/5	1/4	1/4	2/3	3/2	4/1	5/0	5/0	100	0
0 (контроль)	0/5	0/5	1/4	1/4	2/3	4/1	5/0	5/0	5/0	100	0

ления хорошо заметны на конидиогенной клетке (рис. 1, г). Конидии гиалиновые, одноклеточные, $7\text{--}10 \times 3\text{--}5$ мкм, с гладкой поверхностью, булаво-видные, постепенно сужающиеся в базальной части, с усечённым основанием. В процессе длительного культивирования в течение 3—6 месяцев строма претерпевает изменения. Образуются тёмно-коричневые полушаровидные распростёртые

стромы (рис. 1, б), состоящие из плотного сплетения темноокрашенных гиф, из-за чего поверхность колонии приобретает бугристый характер. На этом этапе исследования был сделан вывод о принадлежности грибного штамма ИНА 01108 к аскомицетам класса *Sordariomycetes*. С помощью электронной микроскопии было показано наличие простой поры и приуроченных к ней телец

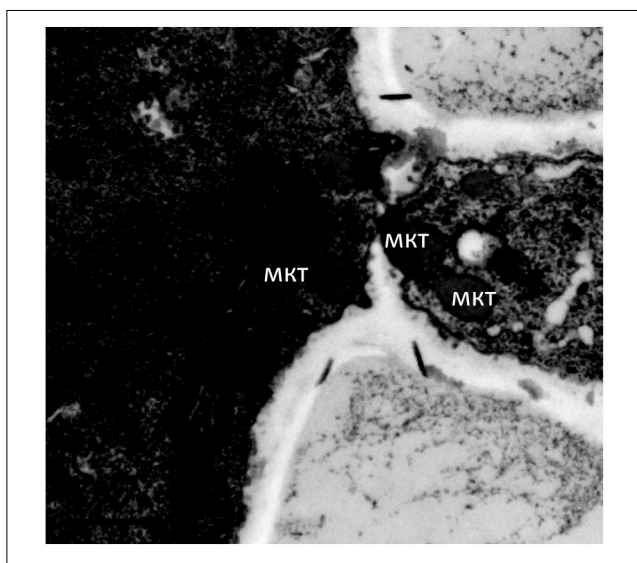


Рис. 2. Межклеточная септа с поровым каналом и тельцами Воронина (мкт) штамма ИНА 01108.

Трансмиссивная электронная микроскопия, масштабный отрезок 0,5 мкм.

Воронина, что подтверждает принадлежность штамма ИНА 01108 к аскомицетам (рис. 2).

Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК штамма ИНА 01108 проводили путем сравнения с материалами базы данных NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Установлено, что наиболее близкой последовательностью (совпадение 99%) обладают несколько штаммов аскомицетов — эндобионтов растений и лишайников из класса *Sordariomycetes* [13].

В условиях глубинного культивирования штамм ИНА 01108 проявляет антибиотическую активность как в отношении грамположительных,

так и грамотрицательных бактерий. Исследование в ходе выделения антибиотических веществ показало, что их образуется не менее четырёх. Основной компонент, идентифицированный как эремоксиларин А, максимально образуется на 7 сутки второй стадии культивирования и сохраняется в культуральной жидкости на высоком уровне до 14 суток культивирования. Выделение эремоксиларина А проводили на 7 сутки культивирования на второй стадии ферментации, продуктивность штамма ИНА 01108 составляла от 110 до 140 мг/л.

Структура эремоксиларина А (рис. 3) была подтверждена методами ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии (табл. 1), масс-спектрометрией высокого разрешения HRMS (ESI) и ИК-спектроскопии (табл. 2). ЯМР спектры были уточнены с помощью 2D- ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^1H -NOESY и 2D обратных гетероатомных ^1H - ^{13}C -HMQC и ^1H - ^{13}C -HMBC экспериментов. ^1H и ^{13}C ЯМР спектры эремоксиларина А близки к спектрам ранее описанных секвитерпенов — аналогов эремоксиларинов, обладающих бициклической структурой [4]. Масс-спектр высокого разрешения эремоксиларина А содержал пики, соответствующие молекулярным ионам $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}-\text{H}]^-$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$. В ИК-спектрах эремоксиларина А наблюдалось поглощение, характерное для карбоксильной группы вблизи $1800\text{--}1650\text{ см}^{-1}$, сопряжённой с двойной связью кето-группы 1684 см^{-1} , сопряжённой с двойной связью альдегидной группы 1621 см^{-1} .

Было установлено, что МПК эремоксиларина А в отношении грамположительных бактерий колеблется от 0,25 до 1 мкг/мл, причём независимо от их устойчивости к бета-лактамам (штаммы MRSA и MSSA) и гликопептидным антибиоти-

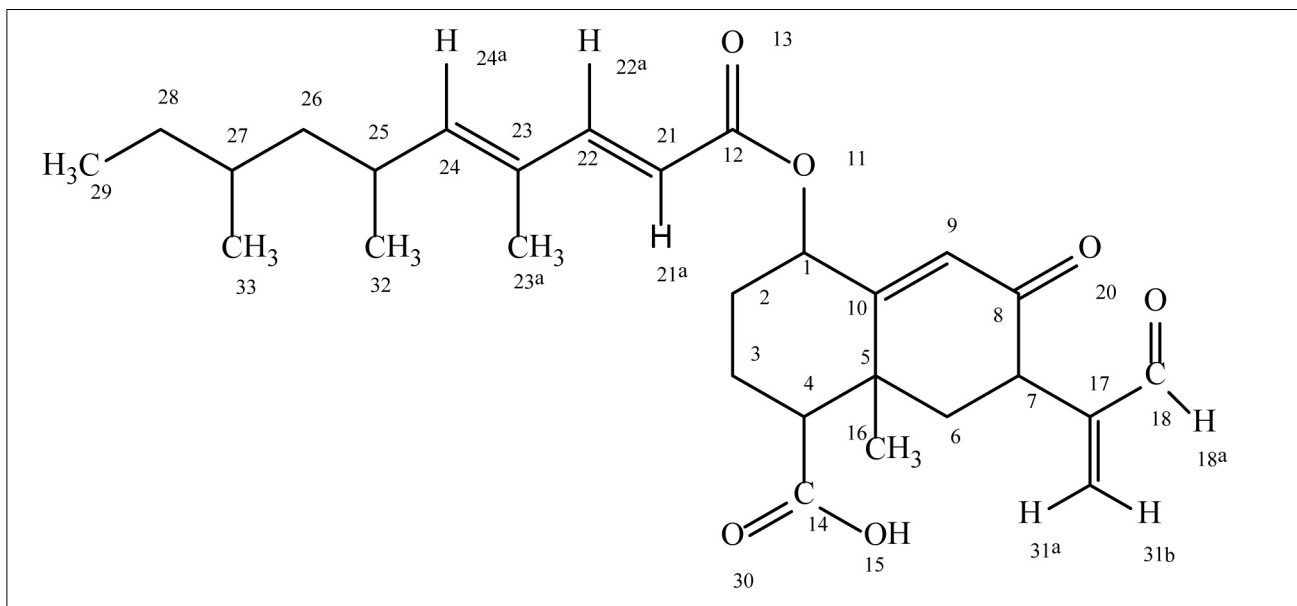


Рис. 3. Антибиотик эремоксиларин А.

кам группы ванкомицина (VR; штамм *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177 устойчив к ванкомицину в количестве 400 мкг/мл). В отношении грамотрицательных бактерий активности нет, а наблюдаемая активность культуральной жидкости в отношении *Escherichia coli* ATCC 25922, следовательно, связана с другим неидентифицированным антибиотиком штамма ИНА 01108 (табл. 3).

В опытах на мышах показано, что эремоксиларин А в дозах 50, 25 и 12,5 мг/кг проявляет токсичность, особенно выраженную в дозе 50 мг/кг. Доза 6,25 мг/кг сопровождается 100% излечением и выживаемостью животных (табл. 4). Доза 3,12 мг/кг близка к ЕД₅₀ (50% выживаемости животных). Доза 1,56 мг/кг приводит к 100% гибели животных. Также 100% гибель животных наблюдали в контроле на 8-е сутки. Таким образом, нетоксичной дозой в испытаниях на модели стафилококкового сепсиса мышей является доза 6,25 мг/кг, однако она всего лишь в 2 раза отличается от дозы ЕД₅₀.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М.: 1987; 693—702. / *Ovchinnikov Ju. A. Bioorganicheskaja himija. M.: 1987; 693—702. [in Russian]*
2. Погребняк А.В., Поройков В.В., Старых В.В., Коновалов Д.А. Компьютерный прогноз противоопухолевой активности сесквитерпеновых лактонов, обнаруженных в представителях семейства *Asteraceae*. Растит ресурсы. 1998; 34: 1: 61—64. / *Pogrebnyak A.V., Porojkov V.V., Staryh V.V., Konovalov D.A. Komp'yuternyj prognoz protivopuholevoj aktivnosti sесkvitерpenovyh laktonov, obnaruзhennyh v predstaviteljah semejstva Asteraceae. Rastit resursy. 1998; 34: 1: 61—64. [in Russian]*
3. Wen J., You K., Lee S., Song C., Kim D. Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *J Biol Chem* 2002; 277: 41: 38954—38964.
4. McDonald L.A., Barbieri L.R., Bernan V.S., Janso J., Lassota P., Carter G.T. 07H239-A, a new cytotoxic eremophilane sesquiterpene from the marine-derived xylariaceous fungus LL-07H239. *J Nat Prod* 2004; 67: 1565—1567.
5. Zang S., Won Y. K., Ong C. N., Shen H. M. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005; 5: 239—249.
6. Shiono Y., Murayama T., Takahashi K., Okada K., Katohda S., Ikeda M. Three oxygenated cyclohexenone derivatives, produced by an endophytic fungus. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 287—292.
7. Luna-Herrera J., Costa M. C., Gonzalez H. G., Rodrigues A. I., Castilho P. C. Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Lauins* spp. *Antimicrob Chemother* 2007; 59: 548—552.
8. Патент US 7230033 B2., 2007. Dolan M. C., Panella N.A., Dietrich E. B. G., Karchesy J.J., Maupin G. O. Pest control compositions and methods for their use. / Patent US 7230033 B2., 2007. Dolan M. C., Panella N.A., Dietrich E. B. G., Karchesy J.J., Maupin G. O. Pest control compositions and methods for their use. [in Russian]
9. Патент WO 2011050481 A1, 2010. Zhang J., Ji X., Liu J., Zidichouski J., Wang Y.. New eremophilane sesquiterpene lactones from senecio jacobaea. / Patent WO 2011050481 A1, 2010. Zhang J., Ji X., Liu J., Zidichouski J., Wang Y.. New eremophilane sesquiterpene lactones from senecio jacobaea. [in Russian]
10. Toledo J.S., Ambrosio S.R., Borges C.H.G., Manfrim V., Cerri D.G., Cruz A.K., Da Costa F.B. *In vitro* leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. *Molecules* 2014; 19: 6070—6079.
11. Shiono Y., Murayama T. New eremophilane-type sesquiterpenoids, eremoxylarins A and B from xylariaceous endophytic fungus YUA-026. *Z Naturforsch* 2005; 60: 885—890.
12. Ogasawara Y., Yoshida J., Shiono Y., Migakawa T., Kimura K. New eremophilane sesquiterpenoid compounds, eremoxylarins A and B directly inhibit calcineurin in a manner independent of immunophilin. *J Antibiot* 2008; 61: 8: 496—502.
13. U'ren J. M., Lutzoni F., Miadlikowska J., Laetsch A. D., Arnold A. E. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *Amer J Bot* 2012; 99: 5: 898—914.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ефременкова О. В. — руководитель сектора, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва. E-mail: ovefr@yandex.ru

Васильева Б. Ф. — н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Зенкова В. А. — с.н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Королев А. М. — в.н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Лузиков Ю. Н. — с.н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Ефименко Т.А. — н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

В настоящее время широко распространена устойчивость болезнетворных бактерий к антибиотикам бета-лактамовой группы. До недавнего времени против таких бактерий использовались антибиотики гликопептидной природы группы ванкомицина, однако продолжается распространение устойчивых форм бактерий также к антибиотикам этой группы. В связи с этим существует острая потребность во введении в медицинскую практику новых эффективных антибиотиков. По нашим данным, эремоксиларин А эффективен в отношении устойчивых форм грамположительных бактерий, однако допустимый диапазон лечебных доз очень узок. Химическая структура эремоксиларина А позволяет модифицировать данный антибиотик, и проведение таких исследований может быть целесообразным для получения менее токсичного производного, не утратившего ценных антимикробных свойств.

Маланичева И.А. — с.н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Мирчинк Е.П. — в.н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Исакова Е.Б. — н.с., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Биланенко Е.Н. — с.н.с., Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра микологии и альгологии, Москва

Камзолкина О.В. — профессор, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра микологии и альгологии, Москва

Сравнительное изучение противоопухолевой активности полисахаридов из мицелия *Ganoderma lucidum* в опытах *in vivo*

Л. М. КРАСНОПОЛЬСКАЯ¹, М. С. ЯРИНА¹, А. В. АВТОНОМОВА¹,
А. И. УСОВ², Е. Б. ИСАКОВА¹, В. М. БУХМАН^{1,3}

¹ НИИ новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

² Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

³ Российский онкологический научный центр. им. Н. Н. Блохина МЗ РФ, Москва

Antitumor Activity of Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* Mycelium: *in vivo* Comparative Study

L. M. KRASNOPOLSKAYA, M. S. YARINA, A. V. AVTONOMOVA, A. I. USOV, E. B. ISAKOVA, V. M. BUKCHMAN

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow

Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

Из погруженного мицелия *Ganoderma lucidum* выделены фракции водорастворимых и щёлочерастворимых полисахаридов, а также водорастворимый полисахарид фукогалактан и щёлочерастворимый полисахарид ксиломаннан. Все полисахаридные препараты показали противоопухолевую активность в опытах *in vivo* на моделях перевиваемых мышинных опухолей при пероральном введении. Наибольшая активность была отмечена у ксиломаннана и фукогалактана. Чувствительность к ксиломаннану была выше при аденокарциноме Ca755 по сравнению с Т-клеточным лимфолейкозом P388. Противоопухолевая активность суммарных фракций водорастворимых полисахаридов из мицелия и базидиом использованного штамма *G. lucidum* была практически одинакова. Максимальный противоопухолевый эффект суммарной фракции водорастворимых полисахаридов мицелия был получен при использовании суточной дозы 2 мг/кг.

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*, мицелий, погруженное культивирование, полисахариды, фукогалактан, ксиломаннан, противоопухолевая активность.

Fractions of water soluble and alkali soluble polysaccharides, as well as fucogalactan, a water soluble polysaccharide, and xylo-mannan, an alkali soluble polysaccharide, were isolated from the *Ganoderma lucidum* submerged mycelium. When administered orally, the polysaccharides showed antitumor activity *in vivo* on murine models of solid tumors. Xylomannan and fucogalactan showed the highest antitumor activity. Sensitivity to xylomannan was more pronounced in adenocarcinoma Ca755 as compared to the T-cell lymphocytic leukemia P388. The antitumor activity of the water soluble polysaccharides total fractions from the mycelium and fruiting bodies of the *G. lucidum* strain was almost identical. The maximum antitumor effect of the mycelium water soluble polysaccharides total fraction was observed with the use of the daily dose of 2 mg/kg.

Key words: *Ganoderma lucidum*, mycelium, submerged cultivation, polysaccharides, fucogalactan, xylomannan, antitumor activity.

Введение

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst. — трютовик лакированный известен как продуцент различных по химической природе и спектру действия биологически активных веществ, в том числе полисахаридов, обладающих противоопухолевым, иммуномодулирующим, противовирусным, гепатопротекторным, антиоксидантным, гипогликемическим, антидиабетическим и кардиотонизирующим действием [1—5]. Биологически активные полисахариды содержатся в базидиомах и

базидиоспорах гриба, в его вегетативном мицелии и культуральной жидкости, получаемой при погруженном культивировании [2, 6, 7].

Серьёзное внимание исследователей привлекает способность полисахаридов *G. lucidum* оказывать противоопухолевое действие. Выявлен ряд таких соединений, установлено их химическое строение [8].

Изучение противоопухолевых свойств полисахаридов *G. lucidum*, как и других лекарственных грибов, проводят *in vivo*, поскольку это действие не является прямым и основано на активации противоопухолевого иммунитета [9]. Оценивая противоопухолевую эффективность полисахаридных препаратов, учитывают путь их введения, дозу, длительность курса лечения и др.

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11. НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе

На сегодня вопрос о перспективах использования препаратов метаболитов *G.lucidum* в онкологической практике является достаточно дискуссионным. Это связано с недостаточным объёмом доступной информации о клинических испытаниях, неполной характеристикой использованных фармакологических субстанций и проблемами их стандартизации. Получение в строго контролируемых условиях погруженного мицелия и использование его в качестве исходного сырья для выделения биологически активных полисахаридов создает основу для обеспечения постоянства состава целевых препаратов и, как следствие, воспроизводимости биологических эффектов.

Целью настоящей работы явилось получение и сравнительное изучение в опытах *in vivo* самостоятельного противоопухолевого действия фракций полисахаридов и индивидуальных полисахаридов, выделенных из погруженного мицелия *G.lucidum*, при их пероральном введении.

Материал и методы

В работе был использован штамм 5-1 *G.lucidum* из коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений ФГБНУ «НИИНА».

Погруженное культивирование было проведено в колбах на качалке по описанному способу [10]. Погруженную культуру лиофилизировали и изучали её противоопухолевое действие. Для выделения полисахаридов использовали погруженный мицелий. Его отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через бязь, сушили при 40 °С и измельчали на лабораторной мельнице.

Получение базидиом проводили по методу [11], основной субстрата служило зерно ячменя. Инокуломом служила погруженная культура *G.lucidum*.

Приготовление полисахаридных препаратов *G.lucidum*. Из водного экстракта мицелия, полученного автоклавированием (1,2 атм., 2 ч) навески измельчённого мицелия гриба (36 г/л) в дистиллированной воде, осаждали суммарную фракцию водорастворимых полисахаридов погруженного мицелия (Ф-1) путём добавления в водный экстракт 4 объёмов 96% этанола. Осадок отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин и лиофилизировали. Водорастворимую полисахаридную фракцию с помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в СI-форме разделяли на нейтральные и кислые компоненты, фракции Ф-1.1, Ф-1.2, Ф-1.3. Последующая хроматография нейтральных компонентов (фракция Ф-1-1) на той же колонке в боратной форме позволила выделить полисахарид, фукогалактан [12].

После водной экстракции мицелий обрабатывали 1 М NaOH при 20 °С, осадок отделяли центрифугированием, к супернатанту прибавляли концентрированную соляную кислоту до слабокислой реакции. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали водой, этанолом, ацетоном и высушивали в вакууме. В результате была получена полисахаридная фракция Ф-2, нерастворимая в воде. Раствор, оставшийся после осаждения фракции Ф-2, диализовали, концентрировали и лиофилизировали, получали растворимую в воде фракцию Ф-3. Из щелочного раствора фракции Ф-2 действием реактива Фелинга осаждали полисахарид ксиломаннан в виде медного комплекса. Этот осадок отделяли, промывали подкисленным этанолом для удаления ионов меди, затем ацетоном и высушивали, получали индивидуальный ксиломаннан [13].

Изучение противоопухолевого действия препаратов проводили на моделях *in vivo*. Были использованы модели лимфомы

P388, аденокарциномы Ca755. Мышей B6D2F1 получали из питомника РАМН «Крюково». После поступления мышей выдерживали 21 день в карантине. Количество мышей в контрольных и экспериментальных группах составляло 8—10 животных. Инокуляция опухолевых клеток проводилась в день «0» подкожно, в количестве 10⁶ клеток/мышь для всех опухолей. Введение испытуемых препаратов проводили ежедневно, начиная со 2-х или 3-х сут опыта, длительность курса лечения в разных опытах варьировала от 5 до 14 сут. Препараты вводили с помощью зонда внутривентриально. Препараты водорастворимых полисахаридов вводили в виде водных растворов, препараты полисахаридов нерастворимых в воде — в виде ультрасуспензии в крахмальном клеестере. В течение экспериментов следили за ростом опухоли. Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле: $ТРО (\%) = (M_k - M_o) / (M_k) \times 100$, где M_k и M_o — средняя расчётная масса опухоли (РМО) в контроле и опыте соответственно. Массу опухоли рассчитывали по формуле $РМО (mg) = (a \times b \times c) / 2$, где РМО — расчётная масса опухоли, а, b, c — три наибольших взаимоперпендикулярных диаметра опухолевого узла в мм. Достоверность различий средних значений массы опухоли определяли по *t*-критерию Стьюдента. За достоверные принимали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

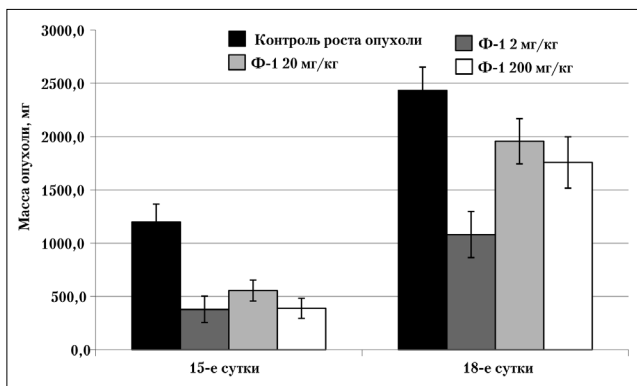
Погруженную культуру отобранного ранее штамма *G.lucidum*, полученную по разработанному способу [10], лиофилизировали и оценивали её противоопухолевую активность. Для этого использовали модель Т-клеточного лимфолейкоза Р388, суточная доза испытуемого образца была рассчитана, исходя из содержания полисахаридов и ранее полученных результатов изучения противоопухолевой активности [14] и составила 50 мг/кг. Лиофилизированную погруженную культуру *G.lucidum* вводили внутривентриально с 3 по 17 сут опыта. Результаты эксперимента показали, что исследуемый препарат проявляет противоопухолевое действие, статистически достоверное на 14-е сут опыта. Торможение роста опухоли при этом составило 50%. Далее показатель торможения роста опухоли снижался до 22% на 17-е сут опыта, хотя лечение продолжалось весь этот период. Противоопухолевое действие могло быть связано с наличием в мицелии и культуральной жидкости *G.lucidum* как полисахаридов, так и тритерпенов [4].

Погруженный мицелий *G.lucidum* использовали для выделения полисахаридных препаратов. В результате были получены четыре фракции водорастворимых полисахаридов — суммарная фракция водорастворимых полисахаридов Ф-1 и выделенные из нее фракции Ф-1.1, Ф-1.2 и Ф-1.3, две фракции щёлочерастворимых полисахаридов Ф-2 и Ф-3, а также два индивидуальных полисахарида: водорастворимый фукогалактан (ФГ) и щёлочерастворимый ксиломаннан (КМ). Также в работе исследовали действие суммарной фракции водорастворимых полисахаридов из базидиом изучаемого штамма *G.lucidum* — препарат Ф-4.

Изучение противоопухолевых свойств полученных препаратов водорастворимых полисахаридов погруженного мицелия *G.lucidum* начали

Таблица 1. Торможение роста опухоли под влиянием различных доз суммарной фракции водорастворимых полисахаридов Ф-1. Модель Т-клеточный лимфолейкоз.

Суточная доза, мг/кг	Торможение роста опухоли, %		
	10 сут	14 сут	17 сут
2	80	62	44
4	72	28	26

**Рис. 1. Противоопухолевый эффект суммарной фракции водорастворимых полисахаридов Ф-1 в зависимости от величины суточной дозы.**

Модель — Т-клеточный лимфолейкоз Р388.

с выбора суточной дозы. Опыты были проведены с использованием суммарной фракции водорастворимых полисахаридов Ф-1 и модели перевиваемого Т-клеточного лимфолейкоза Р388. Полисахаридные препараты вводили внутривенно в течение 10 дней, начиная со 2 сут опыта после инокуляции опухолевых клеток. В первом опыте суточные дозы фракции Ф-1 составили 2, 20 и 200 мг/кг. Наибольший противоопухолевый эффект был получен при использовании Ф-1 в суточной дозе 2 мг/кг (рис. 1). В опыте было отмечено снижение наблюдаемого эффекта после завершения курса лечения.

Далее с использованием той же модели провели сравнение действия двух суточных доз: отобранной в предыдущем опыте дозы 2 мг/кг и более низкой — 1 мг/кг. Препарат вводили внутривенно в течение 5 суток. Было показано, что в течение всего опыта противоопухолевый эффект был выше при использовании Ф-1 в дозе 2 мг/кг. Торможение роста опухоли у животных, получавших препарат в суточной дозе 1 мг/кг, составило 38% на 18 сут опыта. Аналогичный показатель у животных, которым вводили Ф-1 в суточной дозе 2 мг/кг, составил 67%.

Таблица 2. Зависимость противоопухолевого действия суммарной фракции водорастворимых полисахаридов Ф-1 от суточной дозы. Модель — аденокарцинома молочной железы Са755

Суточная доза, мг/кг	Торможение роста опухоли, %		
	10 сут	14 сут	18 сут
2	81	88	70
5	40	64	59
10	50	78	77

Серию опытов завершило сравнение отобранной суточной дозы 2 мг/кг с дозой 4 мг/кг. При внутривенном введении препарата Ф-1 в этих суточных дозах в течение 5 сут был установлен более высокий противоопухолевый эффект при использовании дозы 2 мг/кг, о чём свидетельствовали более высокие значения торможения роста опухоли и менее резкое снижение этого показателя после окончания лечения (табл. 1).

Таким образом, в опытах с использованием модели Т-клеточного лимфолейкоза оптимальная суточная доза фракции Ф-1 составила 2 мг/кг.

Выявленные закономерности были подтверждены при использовании другой модели — аденокарциномы молочной железы Са755. Препарат Ф-1 вводили 5 сут, начиная со 2-х сут опыта, в дозах 2, 5 или 10 мг/кг/сут. Наибольший противоопухолевый эффект был отмечен при использовании препарата в суточной дозе 2 мг/кг (табл. 2).

На следующем этапе исследования было проведено сравнительное изучение противоопухолевого действия суммарных фракций водорастворимых полисахаридов из погруженного мицелля и базидиом использованного в работе штамма *G.lucidum* (фракции Ф-1 и Ф-4 соответственно). В качестве модели использовали Т-клеточный лимфолейкоз Р388, полисахаридные препараты вводили внутривенно в течение 5 дней, начиная со 2 сут опыта, в дозе 2 мг/кг в сут. Полученные результаты не выявили достоверных различий в действии этих двух фракций. Так, на 8 сут опыта торможение роста опухоли под воздействием фракции Ф-1 составило 94%, под воздействием фракции Ф-4 — 92%, на 14 суток — 62 и 48% соответственно.

Использование моделей перевиваемых опухолей, в отличие от моделей спонтанных опухолей, позволяет начинать введение препарата как после инокуляции опухолевых клеток, так и до этой процедуры. На следующем этапе с использованием модели Т-клеточного лимфолейкоза Р388 была оценена эффективность Ф-1 при введении её животным на разных стадиях опыта. Полисахариды

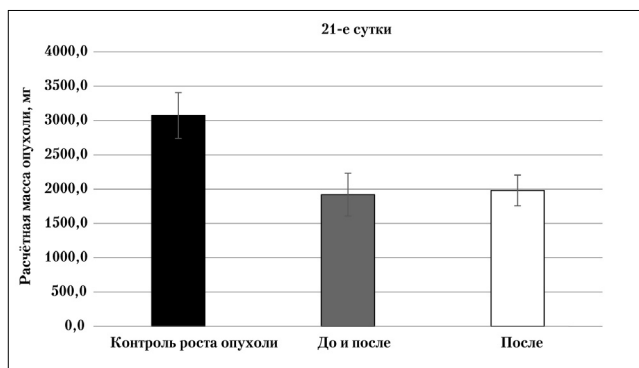


Рис. 2. Противоопухолевый эффект суммарной фракции водорастворимых полисахаридов Ф-1 на модели Т-клеточного лимфолейкоза Р388 на 21-е сут опыта при различных режимах введения препарата.

1 – лечение до и после прививки опухолевых клеток; 2 – лечение после прививки опухолевых клеток.

ридный препарат вводили внутривенно в двух режимах: 1) в течение семи дней до инокуляции опухолевых клеток и семь сут после инокуляции, всего в течение 14 сут, 2) в течение семи сут после инокуляции опухолевых клеток.

Результаты опыта показали, что введение животным препарата Ф-1, предшествующее имплантации опухолевых клеток, не увеличивает противоопухолевый эффект используемого препарата. На 21-е сут опыта обе опытные группы не отличались друг от друга по действию (рис. 2). В дальнейших опытах лечение проводили после имплантации опухолевых клеток.

С применением колонной хроматографии фракция Ф-1 была разделена на три полисахаридных препарата — фракции Ф-1.1, Ф-1.2 и Ф-1.3. Их противоопухолевое действие было протестировано с использованием модели Т-клеточного лимфолейкоза Р388, суточная доза составила 2 мг/кг, препараты вводили внутривенно в течение 10 сут, начиная с третьих сут опыта. В условиях эксперимента торможение роста опухоли под влиянием фракций Ф-1.1, Ф-1.2 и Ф-1.3 не превышало аналогичный показатель, полученный при использовании исходной фракции Ф-1.

Из фракции Ф-1.1 с помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой был выделен индивидуальный полисахарид фукогалактан (ФГ), состоящий из остатков галактозы и фукозы в соотношении 4:1. Было показано, что основу полисахаридных молекул образуют линей-



Рис. 3. Противоопухолевое действие фукогалактана. Модель — аденокарцинома Ca755.

ные цепи из (1→6)-связанных остатков α -D-галактопиранозы, причём каждый четвертый остаток главной цепи в положении 2 несёт боковое ответвление в виде остатка α -L-фукопиранозы [12].

Оценка противоопухолевого действия ФГ была проведена в опыте на модели аденокарциномы Ca755. ФГ вводили внутривенно в виде водного раствора в суточной дозе 2 мг/кг в течение 10 дней, начиная с 3 сут. Результаты опыта продемонстрировали выраженный статистически достоверный противоопухолевый эффект ФГ (рис. 3). Торможение роста опухоли под воздействием ФГ на 18-е сут опыта составило 93%. В дальнейшем торможение роста опухоли постепенно снижалось до 37% на 27-е сут опыта.

Из погруженного мицелля *G.lucidum*, оставшегося после выделения водорастворимых полисахаридов, были извлечены две фракции щёлочерастворимых полисахаридов — Ф-2 и Ф-3, различающиеся степенью растворимости в воде. Изучение противоопухолевого действия этих фракций выявило искомую активность, однако она была невысока. Противоопухолевые эффекты фракций Ф-2 и Ф-3 существенно уступали аналогичному показателю фракции Ф-1. В опыте с использованием модели Т-клеточного лимфолейкоза Р388 было показано, что при внутривенном введении этих фракций в дозе 2 мг/кг в сут в течение 10 сут, начиная с 2 сут опыта, на 14-е сут опыта торможение роста опухоли достигало 49% для фракции Ф-2 и 34% для фракции Ф-3.

Из щёлочерастворимой фракции Ф-2 методом фракционирования с помощью реактива Фе-

Таблица 3. Торможение роста опухоли под влиянием ксилонанна. Модели: Т-клеточный лимфолейкоз и аденокарциномы Ca755.

Суточная доза, мг/кг	Торможение роста опухоли, %				
	Т-клеточный лимфолейкоз Р388		Аденокарцинома Ca755		
	14 сут	18 сут	15 сут	22 сут	27 сут
2	78	34	100	99	88
20	58	33	99	93	35

линга был выделен разветвлённый ксиломаннан. Его главная цепь состоит из (1-3)-связанных остатков α -D-маннопиранозы, большая часть которых замещена по положению 4 единичными остатками β -D-ксилопиранозы или дисахаридными остатками β -D-Манп-(1→3)- β -D-Хулр-(1→ [13].

Противоопухолевое действие выделенного щёлочерастворимого полисахарида КМ было протестировано с использованием двух моделей — Т-клеточного лимфолейкоза Р388 и аденокарциномы Са755. Препарат вводили в виде ультрасуспензии в физиологическом растворе с 3 по 12 сут опыта. Полученные результаты, приведённые в табл. 3, свидетельствуют о выраженной противоопухолевой активности этого соединения. На обеих моделях доза КМ 2 мг/кг в сут при пероральном пути введения обеспечивала больший эффект по сравнению с 20 мг/кг в сут.

Выводы

1. Противоопухолевую активность в опытах *in vivo* и пероральном пути введения показали как лиофилизированная погруженная культура *G.lucidum* штамм 5-1, так и все полисахаридные препараты, выделенные из погруженного мицелия. Это свидетельствует о наличии в мицелии ряда полисахаридов с противоопухолевой активностью. Наибольшая активность была отмечена у препаратов щёлочерастворимого полисахарида ксиломаннана и водорастворимого полисахарида фукогалактана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wasser S. P., Coates P., Blackman M., Cragg G., Levine M., Moss J., White J. Encyclopedia of Dietary Supplements. New York: Marcel Dekker, 2005. Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*). 680—690.
2. Habjancic J., Berovic M., Boh B., Plankl M., Wraber B. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17. New Biotechnol 2015; 32: 1: 85—95.
3. Pana D., Wang L., Chena C., Hub B., Zhou P. Isolation and characterization of a hyperbranched proteoglycan from *Ganoderma lucidum* for anti-diabetes. Carbohydrate Polymers 2015; 117: 106—114.
4. Cheng S., Sliva D. *Ganoderma lucidum* for cancer treatment: we are close but still not there. Integrat Cancer Ther 2015; 1—9.
5. Автономова А.В., Краснополянская Л.М. Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum*). Микол фитопатол 2013; 47: 1: 3—11. / Avtonomova A.V., Krasnopol'skaja L.M. Protivoopuholevye i immunomodulirujushhie svojstva trutovika lakirovannogo (*Ganoderma lucidum*). Mikol Fitopatol 2013; 47: 1: 3—11. [in Russian]
6. Xie Y., Li S., Yee A., La Pierre D., Deng Z., Lee D. *Ganoderma lucidum* inhibits tumour cell proliferation and induces tumour cell death. Enzyme Microb Technol 2006; 40: 177—185.
7. Zheng J., Yang B., Yu Y., Chen Q., Huang T., Li D. *Ganoderma lucidum* polysaccharides exert anti-hyperglycemic effect on streptozotocin-induced diabetic rats through affecting B-cells. Comb Chem High Throughput Screen 2012; 15: 542—550.
8. Ferreira I.C.F.R., Heleno S.A., Reis F.S., Stojkovic D., Queiroz M.J.R.P., Vasconcelos M.H., Sokovic M. Chemical features of *Ganoderma lucidum* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. Phytochemistry 2015; 114: 38—55.
9. Wasser S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 60: 258—274.
2. Противоопухолевая активность исходных фракций не всегда позволяет судить об активности препаратов, которые будут из них получены. Так, из фракции Ф-2, обладающей невысокой противоопухолевой активностью, был выделен высокоактивный полисахарид ксиломаннан.
3. Максимальный противоопухолевый эффект суммарной фракции водорастворимых полисахаридов мицелия при пероральном пути введения был получен при использовании суточной дозы 2 мг/кг. Эту дозу можно рекомендовать для проведения скрининга полисахаридов, обладающих противоопухолевыми свойствами.
4. Не выявлены различия в величине противоопухолевого эффекта суммарных фракций водорастворимых полисахаридов из мицелия и базидиом исследованного штамма *G.lucidum*.
5. Чувствительность использованных моделей к препарату ксиломаннана различалась. В наибольшей степени она была выражена у аденокарциномы Са755. Этот факт, согласуется с ранее полученными результатами [14], показавшими, что аденокарцинома Са755 более чувствительна к полисахаридным препаратам из погруженного мицелия лекарственных грибов *Hericium erinaceus*, *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor* по сравнению с Т-клеточным лимфолейкозом и саркомой 180.
10. Автономова А.В., Краснополянская Л.М., Максимов В.Н. Оптимизация состава питательной среды для погруженного культивирования *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. Микробиология 2006; 75: 2: 1—7. / Avtonomova A.V., Krasnopol'skaja L.M., Maksimov V.N. Optimizacija sostava pitatel'noj sredy dlja pogruzhennogo kultivirovaniya *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. Mikrobiologija 2006; 75: 2: 1—7. [in Russian]
11. Sismets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Third Ed, 2000; 574.
12. Усов А.И., Евсенок М.С., Шашков А.С., Автономова А.В., Краснополянская Л.М. Строение фукогалактана из мицелия *Ganoderma lucidum*. // Иммунопатология, аллергология, инфектология (Труды междисциплинарного микологического форума, 23—24 апреля 2009 г.). 2009; 2: 216. / Usov A.I., Evsenko M.S., Shashkov A.S., Avtonomova A.V., Krasnopol'skaja L.M. Stroenie fukogalaktana iz micelija *Ganoderma lucidum*. // Immunopatologija, allergologija, infektologija (Trudy mezhdisciplinarnogo mikologicheskogo foruma, 23—24 aprlja 2009 g.). 2009; 2: 216. [in Russian]
13. Евсенок М.С., Шашков А.С., Автономова А.В., Краснополянская Л.М., Усов А.И. Полисахариды базидиальных грибов, растворимые в щёлочи полисахариды из мицелия трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. Биохимия 2009; 74: 5: 657—667. / Evsenko M.S., Shashkov A.S., Avtonomova A.V., Krasnopol'skaja L.M., Usov A.I. Polisaharidy bazidial'nyh gribov, rastvorimye v shhelochi polisaharidy iz micelija trutovika lakirovannogo *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. Biohimija 2009; 74: 5: 657—667. [in Russian]
14. Бухман В.М., Трещалина Е.М., Краснополянская Л.М., Исакова Е.Б., Седякова Л.А., Автономова А.В., Леонтьева М.И., Соболева Н.Ю., Белицкий И.В., Баканов А.В. Получение и биологические свойства водных экстрактов и их композиций из мицелия базидиомицетов. Антибиотики и химиотерапия 2007; 52: 1—2: 4—9. / Buhman V.M., Treshalina E.M., Krasnopol'skaja L.M., Isakova E.B., Sedakova L.A., Avtonomova A.V., Leont'eva M.I., Soboleva N.Ju., Belickij I.V., Bakanov A.V. Poluchenie i biologicheskie svojstva vodnyh jekstraktov i ih kompozicij iz micelija bazidiomicetov. Antibiotiki i himioter 2007; 52: 1—2: 4—9. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Краснопольская Лариса Михайловна — зав. лабораторией, ФГБНУ «НИИНА» им. Г. Ф. Гаузе, Москва. E-mail: lmkrasnopolska@gmail.com

Ярина М.С. — младший научный сотрудник, ФГБНУ «НИИНА» им. Г. Ф. Гаузе, Москва

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

Усов А.И. — главный научный сотрудник, ФГБНУ «НИИНА» им. Г. Ф. Гаузе, Москва

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

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

Результаты исследования чувствительности к ванкомицину метициллинорезистентных стафилококков в клинических отделениях крупного многопрофильного стационара и рекомендации по оптимизации антибактериальной терапии вызванной ими инфекции

В. А. ВЕРИКОВСКИЙ, О. Е. МИНАКОВ, О. И. ДЕНИСОВА, Е. В. БОНДАРЕНКО

Воронежская областная клиническая больница № 1, Воронеж

Results of Investigation of MRSA Susceptibility to Vancomycin in Clinical Units of Large Multifunctional Hospital and Recommendations on Optimization of Antibacterial Therapy of Staphylococcal Infection

V. A. VERIKOVSKY, O. E. MINAKOV, O. I. DENISOVA, E. V. BONDARENKO

Voronezh Regional Clinical Hospital No. 1, Voronezh

Изучена частота выделения MRSA и MRSE в различных отделениях Воронежской областной больницы по данным локального микробиологического мониторинга за 2014 год. Максимальный удельный вес MRSA регистрировался в ОРИТ — от 38 до 75% штаммов. MRSE штаммы характеризовались более высоким уровнем метициллинорезистентности, преобладая в кардиохирургических отделениях (от 60 до 91% штаммов). Внедрение E-теста для определения чувствительности MRSA к ванкомицину позволяет оценить обоснованность применения различных антибиотиков с MRSA-активностью в стационаре, уменьшив риск неэффективной терапии.

Ключевые слова: MRSA, MRSE, микробиологический мониторинг, E-тест, ванкомицин.

The frequency of MRSA and MRSE isolates in various units of the Voronezh Regional Hospital was investigated by the results of the local microbiological monitoring for 2014. The maximum position of MRSA was recorded in the ICU (38 to 75% of the strains). The MRSA strains were characterized by higher methicillin resistance, mainly from the cardiosurgical units (60 to 91% of the isolates). The use of the E-test for MRSA susceptibility to vancomycin allowed to estimate the validity of the use of various antibiotics active against MRSA in the treatment of inpatients and to reduce the risk of ineffective therapy.

Key words: MRSA, MRSE, microbiological monitoring, E-test, vancomycin.

Стафилококки являются возбудителями большого числа гнойно-септических заболеваний различной степени тяжести. Они обладают природной чувствительностью к бета-лактамам, макролидам, рифампицину, ко-тримоксазолу, фузидину, фосфомицину, клиндамицину. Однако в настоящее время подавляющее большинство штаммов стафилококков продуцируют бета-лактамазы, опосредующие устойчивость к природным пенициллинам и аминопенициллинам [1].

Второй механизм резистентности к бета-лактамам связан с приобретением стафилококками дополнительного пенициллинсвязывающего белка (ПСБ2а) с низкой аффинностью к антибиотикам этой группы. Лабораторным маркером данного ти-

па резистентности является резистентность к цефокситину/оксацилину. Исторически за такими бактериями закрепился термин «метициллинорезистентные стафилококки» (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — MRSA). Метициллинорезистентные стафилококки часто являются возбудителями госпитальной инфекции: инфекционного эндокардита, инфекции кожи и мягких тканей, вентилятор-ассоциированной пневмонии, катетер-ассоциированной инфекции кровотока, послеоперационного менингита, инфекций имплантированных устройств, шунтов, катетеров и других заболеваний и осложнений. В последние годы MRSA выделяют и при внебольничных инфекциях: тяжёлой деструктивной пневмонии, осложнённой инфекции кожи и мягких тканей и др. [1–5].

Воронежская областная клиническая больница № 1 (ОКБ № 1) является крупным учреждением здравоохранения, включающим многопрофиль-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 394066 Воронеж, Московский пр., 151. Воронежская КБ № 1

Удельный вес метициллинорезистентных стафилококков в зависимости от профиля отделений ВОКБ № 1 (по данным за 2014 г.)

Отделение	MRSA, %	MRSE, %
ОРИТ № 4 (для больных нейрохирургического профиля)	—	78
ОРИТ 2-го корпуса (для больных урологического, травматологического, ортопедического, ожогового отделений)	38	—
ОРИТ № 2 (для больных гнойной хирургии, проктологии, пульмонологии, и др. с септическими осложнениями)	75	—
ОРИТ № 1 (для больных после «чистых» оперативных вмешательств)	—	91
Нейрососудистое отделение	22	50
Гематологическое	25	—
Отделение гнойной хирургии	20	—
Отделение торакальной хирургии	16	—
Отделение сосудистой хирургии	13	28
Отделение амбулаторно-поликлинической хирургии	3	15
Отделение нейрохирургии	8	—
ОРИТ № 7 (для больных кардиохирургического профиля)	50	—
Отделение кардиохирургии № 1	17	60
Отделение термической травмы	52	—
Отделение ортопедии	21	—

Примечание. ОРИТ — отделение реанимации и интенсивной терапии.

ный стационар на 1757 коек. В 2014 г. было пролечено 62461 больной, из них 54% составили больные хирургического профиля. С 2000 г. в больнице ведётся локальный микробиологический мониторинг, результаты которого учитываются при выборе эмпирической антибактериальной терапии, формировании заявок на закупку антибиотиков [6, 7]. Учитывая большую клиническую значимость MRSA-инфекций во всём мире и в каждом конкретном стационаре, необходимо оценивать локальные данные по распространённости данного типа резистентности среди стафилококков. В таблице отражена частота выделения метициллинорезистентных стафилококков в различных клинических отделениях ВОКБ № 1 по данным локального микробиологического мониторинга за 2014 г.

Максимальный удельный вес MRSA регистрировался в ОРИТ № 2 — 75% штаммов стафилококков, в ОРИТ № 7 — 50% штаммов, ОРИТ 2-го корпуса — 38% штаммов. Частота выделения эпидермального стафилококка в условиях стационара характеризовалась значительно более высоким уровнем метициллинорезистентности (MRSE), который достигал в некоторых отделениях, таких как кардиохирургия № 1 и ОРИТ № 1, от 60 до 91% штаммов. Чаще всего эпидермальный стафилококк не является возбудителем инфекции, а лишь контаминирует биоматериал. Но его выделение у иммунокомпрометированных больных может иметь клиническое значение и требовать назначения соответствующей антибактериальной терапии.

При данном типе резистентности неэффективны все бета-лактамы: пенициллины, цефалоспорины I—IV поколений, ингибитор-защищённые пенициллины и цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы. Отмечается сочетанная резистентность метициллинорезистентных стафилококков к макролидам, тетрациклам,

фторхинолонам, линкозамидам, рифампицину, что затрудняет выбор адекватной антибактериальной терапии.

Препаратами выбора при инфекции, вызванной метициллинорезистентными стафилококками, являются: ванкомицин, линезолид, цефтаролин, даптомицин, тигециклин. Данные антибиотики наиболее активны в отношении MRSA, имеют разную структуру, механизмы действия, разные клинические показания и ограничения в зависимости от локализации и степени тяжести инфекции. Антибиотики других групп (фторхинолоны, фосфомицин, фузидин, рифампицин, макролиды) рекомендуется назначать лишь при подтверждённой чувствительности возбудителя [1, 4, 8]. В настоящее время показание «лечение стафилококковой инфекции» исключено из инструкции по применению фторхинолона левофлоксацина.

Многие годы основным препаратом выбора при MRSA-инфекции являлся ванкомицин. В настоящее время в стационарах выделяются штаммы со сниженной чувствительностью к ванкомицину, его минимальная подавляющая концентрация (МПК) для них составляет более 0,5 мг/л. Повышение МПК ведёт к неудачам в лечении ванкомицином тяжёлых инфекций, вызванных метициллинорезистентными стафилококками.

Для определения чувствительности стафилококков к ванкомицину во многих микробиологических лабораториях до сих пор рутинно применяется диско-диффузионный метод, несмотря на то что в Российских национальных и Европейских документах для этой цели рекомендуется использовать только метод серийных разведений в бульоне [9—16]. Определение МПК ванкомицина возможно также с использованием Е-теста.

В апреле-мае 2015 г. микробиологической лабораторией ВОКБ № 1 было проведено исследование чувствительности клинических штаммов метицил-

линорезистентных стафилококков с помощью «Е-теста». Было исследовано 80 штаммов MRSA, выделенных из клинического биоматериала больных отделения гнойной хирургии, отделения термической травмы и травматологического отделения. Все штаммы были определены диско-диффузионным методом как «чувствительные» к ванкомицину. Однако из них только 15% имели МПК менее 0,5 мг/л. МПК ванкомицина превышало 1 мг/л более чем в 28% случаев, в 2,5% случаев она составила 3,0 мг/л, а в 1,25% случаев — 5 мг/л. Наиболее высокие показатели МПК ванкомицина определялись среди стафилококков, выделенных из биоматериала больных с термической травмой.

Проведённое исследование ещё раз подтвердило неприемлемость диско-диффузионного метода для оценки чувствительности стафилококков к ванкомицину. Согласно полученным данным риск неудачной антибактериальной терапии MRSA-инфекции при применении ванкомицина был вероятен более чем в 67% случаев.

Полученные данные полностью совпадают с результатами многоцентрового исследования CERBERUS (2012 г.), в котором исследовались метциллинорезистентные стафилококки из крупных стационаров 36 городов России. Они подтверждают необходимость пересмотра тактики антибактериальной терапии и ассортимента закупаемых антибиотиков, а также дифференцированного подхода к выбору антибиотика в конкретных клинических ситуациях.

Российскими национальными рекомендациями «Стратегия и тактика применения антимикробных средств в лечебных учреждениях России» 2012 г. при выделении штаммов MRSA с МПК более 0,5 мг/л для антибактериальной терапии тяжёлой инфекции рекомендуется использовать более высокие дозы ванкомицина — 3–4 г/сут. Для лечения инфекций, вызванных штаммами с МПК 2,0 мг/л и более рекомендуется использовать антибиотики, альтернативные ванкомицину. Увеличение суточной дозы ванкомицина может серьёзно повысить частоту осложнений, связанных с токсичностью препарата (преимущественно нефротоксичностью). При высоком риске осложнений препаратами выбора в зависимости от клинической ситуации могут быть: цефтаролин (Зинфоро), даптомицин (Кубисин), линезолид (Зивокс) и тигециклин (Тигаил). Все перечисленные антибиотики показаны для лечения инфекции кожи и мягких тканей [2, 5, 17–24]. При наличии бактериемии предпочтение должно отдаваться антибиотикам с бактерицидным действием: цефтаролину, даптомицину. Однако необходимо учитывать, что суточные дозы указанных препаратов при

бактериемии должны быть выше, чем при осложнённых инфекциях кожи и мягких тканей [20, 23].

Имеются некоторые различия в режиме дозирования цефтаролина и даптомицина в зависимости от показаний. Оптимальный режим дозирования даптомицина при стафилококковой инфекции кожи и мягких тканей — 4 мг/кг 1 раз в сутки. При стафилококковой бактериемии и правостороннем инфекционном эндокардите требуется более высокая суточная доза даптомицина — 6 мг/кг 1 раз в сутки. Цефтаролин назначается при инфекции кожи и мягких тканей по 0,6 г 2 раза в сутки. Концентрация препарата в крови при данном режиме дозирования у больных с инфекцией кровотока, бактериемией недостаточна и возможна неэффективность терапии. В настоящее время ожидается внесение дополнения в инструкцию по применению цефтаролина при бактериемии, так как доказана его эффективность в дозе 1,8 г/сут (по 0,6 г каждые 8 ч). Линезолид и тигециклин являются бактериостатиками, что ограничивает их применение при бактериемии [19].

Показаниями к применению цефтаролина и тигециклина является внебольничная пневмония [2]. Имеются экспериментальные данные по успешному использованию цефтаролина и при вентилятор-ассоциированной пневмонии, возбудителем которой зачастую является MRSA [20]. Даптомицин при пневмониях не применяется в силу особенностей фармакокинетики и воздействия на сурфактант [23]. Линезолид показан при пневмониях, в том числе госпитальных. Данный антибиотик стал практически единственным препаратом выбора с MRSA-активностью для антибактериальной терапии поздних вентилятор-ассоциированных пневмоний в отделениях реанимации и интенсивной терапии. В ближайшее время должны появиться новые антибиотики с действием против MRSA из группы гликопептидов (телаванцин) и др. [17, 18].

Заключение

Проблема антибиотикорезистентности возбудителей гнойно-септических заболеваний имеет глобальное значение, о чем свидетельствуют результаты наблюдений различного уровня (национальных, региональных). Для осознания масштабов распространённости резистентных штаммов возбудителей необходимо внедрять современные методики детекции антибиотикорезистентности, что позволит получать достоверные локальные данные микробиологического мониторинга. Внедрение Е-теста для определения чувствительности MRSA к ванкомицину позволяет оценить обоснованность применения различных антибиотиков с MRSA-активностью в стационаре, уменьшив риск неэффективной антибактериальной терапии, в том числе эмпирической.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов Ю.Б., Стречунский Л.С., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной терапии. Смоленск: 2007; 464. /

- Belousov Ju.B., Strachunskij L.S., Kozlov S.N. Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfekcionnoj terapii. Smolensk: 2007; 464. [in Russian]

2. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Академик РАМН, Чучалин А.Г.,

- проф. Синопальников А.И., проф. Козлов Р.С. и соавт. Российское респираторное общество. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антибактериальной химиотерапии (МАКМАХ). М.: 2014; 106. / Vneboľnichnaja pnevmonija u vzroslyh: prakticheskie rekomendacii po diagnostike, lečeniju i profilaktike. Akademik RAMN, Chuchalin A.G., prof. Sinopal'nikov A.I., prof. Kozlov R.S. i soavt. Rossijskoe respiratornoe obshhestvo. Mezhhregional'naja asociacija po klinicheskoj mikrobiologii i antibakterial'noj himioterapii (MAKMAH). M.: 2014; 106. [in Russian]
3. Научный отчет о результатах исследования антибиотикорезистентности бактериальных возбудителей нозокомиальных инфекций в отделениях с интенсивным использованием антибиотиков в стационарах России (РеВАНШ). НИИ антимикробной химиотерапии. Смоленск: 2009. / Nauchnyj otchet o rezul'tatah issledovanija antibiotikorezistentnosti bakterial'nyh vozбудitelej nozokomial'nyh infekcij v otdelenijah s intensivnym ispol'zovanijem antibiotikov v stacionarah Rossii (ReVANS). NII antimikrobnj himioterapii. Smolensk: 2009. [in Russian]
 4. Стратегия и тактика применения антимикробных средств в лечебных учреждениях России: Российские национальные рекомендации / Под ред. В.С.Савельева, Б.Р.Гельфанда, С.Я.Яковлева. М.: ООО «Компания БОРГЕС», 2012; 92. / Strategija i taktika primeneniya antimikrobnnyh sredstv v lečebnyh uchrezhdenijah Rossii: Rossijskie nacional'nye rekomendacii / Pod red. V.S.Savel'eva, B.R.Gel'fanda, S.Ja.Jakovleva. M.: ООО «Kompanija BORGES», 2012; 92. [in Russian]
 5. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. Российские национальные рекомендации / Под ред. В.С. Савельева. Российское общество хирургов. Российская ассоциация специалистов по хирургическим инфекциям. Альянс клинических химиотерапевтов и микробиологов. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антибактериальной химиотерапии. Ассоциация флегмологов России. 2009; 89. / Hirurgicheskie infekcii kozhi i m'jagkih tkanej. Rossijskie nacional'nye rekomendacii / Pod red V.S. Savel'eva. Rossijskoe obshhestvo hirurgov. Rossijskaja asociacija specialistov po hirurgicheskim infekcijam. Al'jans kliničeskikh himioterapevtov i mikrobiologov. Mezhhregional'naja asociacija po klinicheskoj mikrobiologii i antibakterial'noj himioterapii. Asociacija flebologov Rossii. 2009; 89. [in Russian]
 6. Денисова О.И., Клименко Г.Я. Организация контроля и лечения госпитальной инфекции в региональном многопрофильном стационаре с позиций доказательной медицины. Бюллетень Национального НИИ общественного здоровья РАМН, Материалы научно-практической конференции «Роль здравоохранения в охране общественного здоровья». М.: 2005; 3: 54–58. / Denisova O.I., Klimenko G.Ja. Organizacija kontrolja i lečeniija gospi tal'noj infekcii v regional'nom mnogoprofil'nom stacionare s pozicij dokazatel'noj mediciny. Bju lleten' Nacional'nogo NII obshhestvennogo zdorov'ja RAMN, Materialy nauchno-praktičeskoj konferencii «Rol' zdavoohranenija v ohrane obshhestvennogo zdorov'ja». M.: 2005; 3: 54–58. [in Russian]
 7. Организация контроля антибиотикорезистентности возбудителей госпитальной инфекции как существенного фактора повышения летальности в многопрофильном стационаре. Денисова О.И., Клименко Г.Я. Сб. научных трудов Всероссийской научно-практической конференции «Преждевременная и предотвратимая смертность в России — критерии потери здоровья населения». М.: РИО ЦНИИО-ИЗ; 2006: 183–188. / Organizacija kontrolja antibiotikorezistentnosti vozбудitelej gospi tal'noj infekcii kak sushhestvennogo faktora povyshenija letal'nosti v mnogoprofil'nom stacionare. Denisova O.I., Klimenko G.Ja. Sb. nauchnyh trudov Vserossijskoj nauchno-praktičeskoj konferencii «Prezhdevremennaja i predotvratimaja smertnost' v Rossii — kritierii poteri zdorov'ja naselenija». M.: RIO CNIIOIZ; 2006: 183–188. [in Russian]
 8. Рациональная антимикробная фармакотерапия: рук. для практикующих врачей / Под ред. В.П. Яковлев, С.В. Яковлев и др. М.: Литтерра, 2003; 1008. / Racional'naja antimikrobnaja farmakoterapija: ruk. dlja praktikujushhih vrachej / Pod red. V.P. Jakovlev, S.V. Jakovlev i dr. M.: Litterra, 2003; 1008. [in Russian]
 9. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. / МУК 4.2.1890-04. Opredelenie čuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskie ukazanija. [in Russian]
 10. Национальный Стандарт ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни. / Nacional'nyj Standart GOST R ISO 20776-1-2010 Klinicheskie laboratornye issledovanija i diagnosticheskie test-sistemy *in vitro*. Issledovanie čuvstvitel'nosti infekcionnyh agentov i ocenka funkcional'nyh harakteristik izdelij dlja issledovanija čuvstvitel'nosti k antimikrobnym sredstvam. Čast' 1. Referentnyj metod laboratornogo issledovanija aktivnosti antimikrobnnyh agentov protiv bystrorastušhih ajerobnyh bakterij, vyzvajushhih infekcionnye bolezni. [in Russian]
 11. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Клинические рекомендации / Под ред. Р.С. Козлов, М.В. Сухорукова и соавт. 2014; 154. / Opredelenie čuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. Klinicheskie rekomendacii / Pod red R.S. Kozlov, M.V. Suhorukova i soavt. 2014; 154. [in Russian]
 12. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical, M., and Infectious, D. Terminology Relating to Methods for the Determination of Susceptibility of Bacteria to Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 503–508.
 13. Turnidge J., Kahlmeter G., Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 418–425.
 14. www.eucast.org
 15. ISO 20776-1: 2006 Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
 16. CLSI, M100-S24. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
 17. Дехнич А.В., Зубарева Н.А., Козлов Р.С., Попов Д.А., Романов А.В., Руднов В.А. Телаванцин — новый препарат, активный против полирезистентных грамположительных возбудителей. Клинические и микробиологические аспекты в вопросах и ответах. Клинический микробиол антимикроб химиотер 2015; 17: 2: 127–145. / Dehnych A.V., Zubareva N.A., Kozlov R.S., Popov D.A., Romanov A.V., Rudnov V.A. Telavancin - novyj preparat, aktivnyj protiv polirezistentnyh grampolozhitel'nyh vozбудitelej. Klinicheskie i mikrobiologičeskie aspekty v voprosah i otvetah. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2015; 17: 2: 127–145. [in Russian]
 18. Рубинштейн Э., Лайани Т. и соавт., иссл. Группа ATTAIn. Телаванцин в сравнении с ванкомицином у пациентов с нозокомиальной пневмонией, вызванной грамположительными возбудителями. Clin Infect Dis 2011; 52: 1: 31–40. / Rubinshtein Je., Lajani T. i soavt., issl. Gruppy ATTAIn. Telavancin v sravnenii s vankomicinom u pacientov s nozokomial'noj pnevmoniej, vyzvannoj grampolozhitel'nymi vozбудiteljami. Clin Infect Dis 2011; 52: 1: 31–40. [in Russian]
 19. Андреева И.В., Стецюк О.У., Козлов Р.С. Тигециклин: перспективы применения в клинической практике. Клинический микробиол антимикроб химиотер 2010; 12: 2: 127–145. / Andreeva I.V., Stecyuk O.U., Kozlov R.S. Tigeciklin: perspektivy primeneniya v kliničeskoj praktike. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2010; 12: 2: 127–145. [in Russian]
 20. Ортенберг Э.А. Цефтаролин: накануне использования в России. Клинический микробиол антимикроб химиотер 2013; 15: 3: 212–218. / Ortenberg Je.A. Ceftarolin: nakanune ispol'zovanija v Rossii. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2013; 15: 3: 212–218. [in Russian]
 21. Corey R.G. et al. Integrated analysis of CANVAS 1 and 2: phase 3, multicenter, randomized, double-blind studies to evaluate the safety and efficacy of ceftaroline versus vancomycin plus aztreonam in complicated skin and skin-structure infection. Clin Infect Dis 2010; 51: 6: 641–650.
 22. Corrado M. L. Integrated safety summary of CANVAS 1 and 2 trials: Phase III, randomized, double-blind studies evaluating ceftaroline fosamil for the treatment of patients with complicated skin and skin structure infections. J Antimicrob Chemother November 2010; 65: 67–71.
 23. Raybak M. The efficacy and safety of daptomycin: first in a new class of antibiotics for Gram-positive bacteria. Clin Microbiol Infect 2006; 12: S1: 24–32.
 24. Saravolatz L., Pawlak J., Johnson L. *In vitro* activity of ceftaroline against community-associated methicillin resistant, vancomycin-intermediate, vancomycin-resistant and daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 3027–3030.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Вериковский В. А. — ГБУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1» Зам. гл. врача по медицинской части

Минаков О. Е. — ГБУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1» Зам. гл. врача по хирургии

Денисова О. И. — ГБУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1» зав. отделением клинической фармакологии, к. м. н.

Бондаренко Е. В. — ГБУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1» зав. бактериологической лабораторией

Оптимизация антибиотикопрофилактики при малых гинекологических операциях

М. С. СЕЛИХОВА, С. В. ВДОВИН, М. В. МИХАЙЛОВСКАЯ

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Optimization of Antibiotic Prophylaxis in Minor Gynecologic Operations

M. S. SELIKHOVA, S. V. VDOVIN, M. V. MIKHAILOVSKAYA

Volgograd State Medical University, Volgograd

Целью исследования явилась оценка эффективности разных вариантов антибиотикопрофилактики инфекционных осложнений у пациенток после гистероскопии. Обследовано 109 пациенток, поступивших в стационары для выполнения гистероскопии в плановом порядке, у 55 больных с целью профилактики инфекционных осложнений назначался антибиотик широкого спектра действия внутривенно за 30 минут до операции, 54 женщины получали курс антимикробной терапии в послеоперационном периоде. Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что однократное введение антимикробных препаратов обеспечивает высокий уровень профилактики инфекционных осложнений, а назначение курса противомикробной терапии в послеоперационном периоде не имеет преимуществ по эффективности.

Ключевые слова: плановая гистероскопия, антибиотикопрофилактика, однократное введение, курсовое назначение.

The aim of the study was to estimate the efficacy of various variants of antibiotic prophylaxis of infectious complications in female patients after hysteroscopy. 109 patients were examined. The patients were hospitalized for planned hysteroscopy. 55 of them were treated prophylactically to prevent infectious complications with a broad spectrum antibiotic administered intravenously 30 min prior to the operation. A course antimicrobial therapy during the postoperative period was applied to 54 females. The results of the trial showed that single administration of an antimicrobial provided high level prevention of infectious complications, whereas the use of course antimicrobial therapy during the postoperative period was of no advantage by the efficacy.

Key words: planned hysteroscopy, antibiotic prophylaxis, single administration, course therapy.

Введение

Менее века назад эволюционные взаимоотношения между человеком и микроорганизмом в корне изменились в результате создания антибиотиков. Это стало революцией в борьбе с некогда смертельными инфекциями и человечество получило мощное оружие для устранения патогенных микроорганизмов. Однако, ещё в 1945 году А. Флеминг предупреждал о возможных проблемах, связанных с появлением антибиотикостойчивых штаммов. Резистентность микробов к антибиотикам, по мнению экспертов ВОЗ (2000 г.), принимает масштабы пандемий [1] Именно поэтому в настоящее время широко обсуждаются вопросы рационального использования антимикробных препаратов и целесообразность назначения их с профилактической целью.

Вместе с тем современное развитие медицины, гинекологии в том числе, сопряжено с широким внедрением в повседневную практику врача инвазивных диагностических и лечебных

мероприятий. В настоящее время одним из самых информативных методов диагностики и лечения патологии полости матки является гистероскопия, без которой не обходится ни одно гинекологическое отделение [2–4] Частота этой операции неуклонно возрастает из года в год. Вместе с тем это инвазивное хирургическое вмешательство связано с определённым риском инфекционных осложнений, которые, по данным разных авторов, составляют от 0,7 до 12% [5, 6] По мнению ряда исследователей, после неосложнённых гистероскопических операций нет необходимости в специальных лечебно-профилактических мероприятиях, и пациентка может быть выписана из стационара в день операции или на следующий день [7] Другие авторы придерживаются мнения о необходимости применения антибиотиков в послеоперационном периоде [8] Таким образом, в настоящее время нет единого алгоритма ведения пациенток после гистероскопии и определения риска реализации инфекционных осложнений, и выбор тактики ведения послеоперационного периода в каждом конкретном случае остается на усмотрение врача.

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 400131, Волгоград, пл.Павших борцов, 1, ВолгГМУ

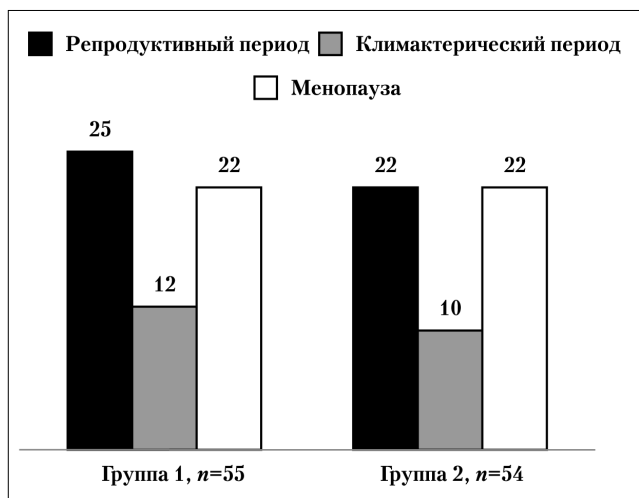


Рис. 1. Распределение пациенток сравниваемых групп по возрастным периодам.

Цель исследования — оценить эффективность разных вариантов антибиотикопрофилактики инфекционных осложнений у пациенток после гистероскопии.

Материал и методы

Исследование было проведено в гинекологических отделениях стационаров города Волгограда. Обследовано 109 пациенток, поступивших в стационары для выполнения гистероскопии в плановом порядке, все пациентки были обследованы в соответствии с общепринятыми стандартами. В зависимости от тактики ведения послеоперационного периода все обследованные пациентки были разделены на две группы: первую группу составили 55 больных, которым с целью профилактики инфекционных осложнений назначался антибиотик широкого спектра действия внутривенно за 30 мин до операции, в послеоперационном периоде антибактериальная терапия не проводилась. Во вторую группу вошли 54 женщины, которым выполнялась гистероскопия в день поступления, без предоперационной подготовки, с целью профилактики воспалительных осложнений им назначался курс антибактериальной терапии в послеоперационном периоде.

Результаты и обсуждение

Возраст обследованных больных в первой группе колебался от 22 до 77 лет и в среднем составил $46,4 \pm 1,8$ лет, во второй группе — от 23 до 76 лет (средний возраст $48,3 \pm 1,8$ лет). Среди пациенток первой группы 25 (45,5%) женщин были репродуктивного возраста, во второй группе — 22 (40,7%). В менопаузальном периоде находились 22 (40%) женщины из первой группы и 22 (40,7%) — из второй группы. Причём в первой группе длительность менопаузы колебалась от 1 до 36 лет, в среднем составила $13,22 \pm 2,7$, а во второй группе от 1 до 26 лет, в среднем $10,45 \pm 1,8$ лет (рис. 1).

По социальным характеристикам больные сравниваемых групп не отличались: служащие в первой группе составили 59,9%, а во второй группе — 35,2%, домохозяйками оказались 38,2 и 44,4% соответственно. Таким образом, по соци-

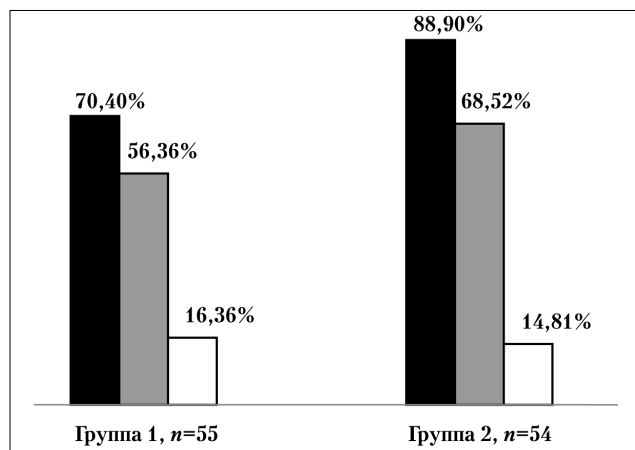


Рис. 2. Соотношение родов, абортов и самопроизвольных выкидышей у пациенток в сравниваемых группах (в %).

ально-биологическим характеристикам группы были сопоставимы.

У большинства обследованных пациенток отмечалось своевременное наступление менструации: (возраст менархе в первой группе колебался от 9 до 18 лет, в среднем составил $13,4 \pm 0,2$ лет, во второй группе — от 10 до 17 лет, в среднем $13,5 \pm 0,2$). В то же время анализ менструальной функции в репродуктивном возрасте показал, что её нарушения были выявлены у 32 (58,2%) пациенток первой группы и у 25 (46,3%) второй группы. Возможно, одним из факторов нарушений менструального цикла была высокая частота прерываний беременности по желанию у пациенток обеих групп. Так, 31 (56,36%) пациентка первой группы имела в анамнезе медицинские аборты, во второй группе — 37 (68,52%). Причём у 19% пациенток первой группы и у 30% — во второй было более двух абортов. Среднее количество абортов на одну пациентку составило $2,1 \pm 0,3$ (от 1 до 10) у пациенток первой группы и $2,6 \pm 0,5$ (от 1 до 18) во второй группе обследованных женщин. Таким образом, прерывание беременности сопряжено не только с риском ранних осложнений, но и имеет негативное влияние на репродуктивное здоровье женщины в целом.

Количество родов в анамнезе у пациенток обеих групп колебалось от 1 до 4 и в среднем составило в первой группе $1,8 \pm 0,2$, во второй группе — $1,9 \pm 0,3$. Хотелось бы обратить внимание, что почти каждая третья пациентка первой группы (29,1%) и каждая десятая (11,1%) — во второй группе не имела в анамнезе родов. Эти данные отражают крайне низкий уровень рождаемости, который не может обеспечить даже воспроизводство населения.

Самопроизвольное прерывание беременности, в том числе замершие беременности, имели в

Структура показаний для гистероскопии у пациенток сравнимых групп

Диагноз	Число больных, абс. (%)	
	первая группа (n=55)	вторая группа (n=54)
Гиперплазия эндометрия	10 (5,5)	11 (5,94)
Гиперплазия эндометрия на фоне хронического эндометрита	6 (3,3)	7 (3,8)
Полипы эндометрия	20 (36,4)	19 (35,2)
Синехии полости матки	5 (9,1)	3 (5,6)
Полип цервикального канала	2 (3,6)	7 (12,9)
Бесплодие. Взятие диагностического соскоба эндометрия	7 (12,75)	2 (3,7)
Субмукозная миома матки	4 (7,3)	3 (5,6)
Послеродовый метроэндометрит. Задержка частей последа	0 (0)	2 (1,9)
Остатки плодного яйца после медицинского аборта	1 (1,85)	0 (0)

анамнезе 9 (16,36%) исследуемых пациенток первой группы и 8 (14,81%) пациенток во второй группе. Данные по соотношению родов, прервавшихся беременностей и медицинских абортотворов представлены на рис. 2.

Структура показаний для гистероскопии у пациенток сравнимых групп представлена в табл. 1.

Наиболее частым показанием для выполнения гистероскопии в обеих группах были полипы эндометрия (36,4% в первой группе и 35,2% во второй группе). У 10,9% больных в первой группе и 18,52% во второй в анамнезе уже были указания на выполнение гистероскопии.

Данные по продолжительности операции ($20,36 \pm 1,04$ мин. в первой группе и $25,76 \pm 0,9$ мин во второй) и объёмах кровопотери ($35,81 \pm 2,4$ мл в первой группе и $29,63 \pm 2,3$ мл во второй) достоверных различий не выявили.

Всем пациенткам первой группы проводилась профилактика инфекционных осложнений путём внутривенного введения антибиотика широкого спектра действия (цефалоспорины III поколения) за 30 мин до операции. В послеоперационном периоде назначались гемостатик (12,5% раствор этамзилата — 2,0 г 2 раза в день внутримышечно). Дополнительно 6 (10,9%) пациенток с высоким риском развития инфекционных осложнений получали курс антибактериальной терапии (цефтриаксон 1,0 г — 2 раза в день внутримышечно — 4 дня, амикацин 1,5 г — 1 раз в день внутримышечно — 3—4 дня). Трёх (5,5%) женщинам были назначены утеротоники (окситоцин 1,0 г — 1 раз в день внутримышечно). Таким образом, фармакологическая нагрузка обследуемых женщин первой группы составляла от 1 до 5 препаратов, в среднем $2,5 \pm 0,1$ на одну пациентку (рис. 3).

Согласно данным историй болезни все 54 (100%) пациентки второй группы получали курс комплексной антимикробной терапии в течение 2—10 дней, в среднем 4,8 дня. С профилактической целью назначались цефотаксим 2,0 г — 1 раз в день внутримышечно или гентамицин 80 мг — 2 раза в день внутримышечно, или доксициклин 0,2 г внутривенно 1 раз в день, или цiproфлокса-

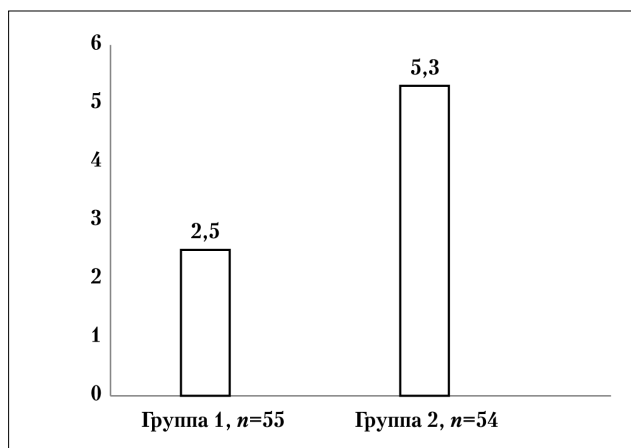


Рис. 3. Фармакологическая нагрузка на одну пациентку в сравнимых группах.

цин 100,0 мг — 2 раза в день внутривенно. Кроме того всем проводилась гемостатическая терапия (12,5% раствор этамзилата 2,0 г — 2 раза в день внутримышечно) и утеротоническая терапия (окситоцин 1,0 г — 2 раза в день внутримышечно). В комплекс лечебных назначений включались также противогрибковые препараты (итраконазол внутрь по 1 капсуле 2 раза в день — 3 дня или флуконазол внутрь 150 мг однократно) и хилак форте по 30 капель внутрь — 3 раза в день. Таким образом, во второй группе каждая пациентка получала от 4 до 10 препаратов, в среднем $5,3 \pm 0,1$ (см. рис. 3).

По данным историй болезней у всех пациенток первой группы послеоперационный период протекал без осложнений, длительность пребывания в стационаре была от 2 до 7 дней, средний койко-день составил $4,18 \pm 0,1$. У 8 (14,8%) пациенток второй группы отмечался субфебрилитет, причём у 4 (7,4%) повышение температуры тела было неоднократное. Пациентки второй группы находились в стационаре от 3 до 10 дней, средний койко-день составил 5,15.

Заключение

Результаты проведённого исследования свидетельствуют, что однократное введение антими-

кробных препаратов перед выполнением плановой гистероскопии обеспечивает высокий уровень профилактики инфекционных осложнений. Назначение курса противомикробной терапии в послеоперационном периоде не имеет преимуществ по эффективности, помимо этого способствует развитию антибиотикорезистентности, что становится проблемой практической медицины. Минимизация инфекционного риска при малых гине-

кологических операциях должна достигаться за счёт обследования пациентки перед выполнением вмешательства и рациональной антибиотикопрофилактики с использованием препаратов широкого спектра действия. Назначение антибиотиков в виде курса оправдано при выполнении срочных операций, когда предварительное обследование пациентки невозможно или в группах высокого риска манифестации воспалительного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. Успехи биологической химии 2004; 44: 263—306. / Sidorenko S.V., Tishkov V.I. Molekuljarnye osnovy rezistentnosti k antibiotikam. Uspехи biologicheskoy himii 2004; 44: 263—306. [in Russian]
2. Гинекология: Национальное руководство / Под ред. В.И. Кулакова и др. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. / Ginekologija: Nacional'noe rukovodstvo / Pod red. V.I. Kulakova i dr. M.: GJeOTAR-Media, 2011. [in Russian]
3. Капушева Л.М., Комарова С.В., Ибрагимова З.А. и др. Выбор метода терапии гиперплазии эндометрия в перименопаузе. Акушерство гинекол 2005; 6: 37—42. / Kapusheva L.M., Komarova S.V., Ibragimova Z.A. i dr. Vybora metoda terapii giperplazii jendometrija v perimenopauze. Akusherstvo ginekol 2005; 6: 37—42. [in Russian]
4. Новикова Е.Г., Саркисов С.Э., Пронин С.М. и др. Эндохирургия в лечении начального рака эндометрия. Вопрос онкол 2005; 4/5: 583—587. / Novikova E.G., Sarkisov S.E., Pronin S.M. i dr. Jendohirurgija v lechenii nachal'nogo raka jendometrija. Vopros onkol 2005; 4/5: 583—587. [in Russian]
5. Сметник В.П., Тумилович Л.Г. Неоперативная гинекология: Руководство для врачей: 3-е изд., перераб. и доп. М.: МИА, 2005; 632. / Smetnik V.P., Tumilovich L.G. Neoperativnaja Ginekologija: Rukovodstvo dlja vrachej: 3-e izd., pererab. i dop. M.: MIA, 2005; 632. [in Russian]
6. Шилина Е.А., Голова Ю.А., Брусенко В.Г. и др. Применение новых технологий для лечения больных с гиперпластическими процессами в эндометрии в период постменопаузы. Росс вест акушера-гинекол 2004; 5: 74—77. / Shilina E.A., Golova Ju.A., Brusenko V.G. i dr. Primenenie novyh tehnologij dlja lechenija bol'nyh s giperplasticheskimi processami v jendometrii v period postmenopauzy. Ross vest akushera-ginekol 2004; 5: 74—77. [in Russian]
7. Brun J.L., Descat E., Boubli B. et al. Endometrial hyperplasia: a review. Gynecol Obstet Biol Reprod 2006; 35: 542—550.
8. Makris N., Kalmantis K., Skartados N. et al. Three-dimensional hysterosonography versus hysteroscopy for the detection of intracavitary uterine abnormalities. Int J Gynecol Obstet 2007; 97: 6—9.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Селихова Марина Сергеевна — д.м.н., профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии Волгоградского государственного медицинского университета, E-mail: selichovamarina@yandex.ru

Вдовин Сергей Васильевич — д.м.н. профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии ФУВ Волгоградского государственного медицинского университета

Михайловская Мария Васильевна — аспирант кафедры акушерства и гинекологии ФУВ Волгоградского государственного медицинского университета

Метааналитический подход к оценке клинической эффективности инфузионного сукцинатсодержащего препарата Ремаксола при патологии печени разного генеза

Н. К. МАЗИНА, П. В. МАЗИН

Кировская государственная медицинская академия Минздрава России, Киров

Metaanalytic Approach to Evaluate Clinical Effectiveness of Infusion Succinate-Containing Remaxol in Liver Pathologies of Diverse Genesis

N. K. MAZINA, P. V. MAZIN

Kirov State Medical Academy, Kirov

Проведён метаанализ опубликованных результатов рандомизированных клинических исследований Ремаксола при различных заболеваниях, сопряжённых с поражениями печени (хронический гепатит В и С, тяжёлое отравление этанолом, лекарственное поражение печени при лечении туберкулёза, лептоспироз, псориаз, полихимиотерапия опухолей). В базу данных включили информацию по 2250 пациентам. Обобщенная группа контроля ($n=1099$) получала традиционную фармакотерапию (активное плацебо), основная группа ($n=1151$) дополнительно Ремаксол. Объединение частотных характеристик позитивных исходов (% исчезновения основных клинических симптомов и осложнений) в группах сравнения позволило дать оценку обобщённой клинической эффективности Ремаксола, которая составила 1,75 по частотным характеристикам исходов. Отношение шансов позитивных исходов составило 5,3 [1,8; 17,0], а число больных, которых необходимо лечить (ЧБНЛ) — 8 [6; 14]. Таким образом, инфузионный гепатопротектор Ремаксол на основе янтарной кислоты обладает статистически и клинически значимой высокой терапевтической эффективностью при фармакологической коррекции патологии печени разного генеза.

Ключевые слова: Ремаксол, метаанализ, гепатопротектор, янтарная кислота, лекарственная патология печени, клиническая эффективность, отношение шансов.

Metaanalysis was applied to the published data on the randomized clinical trials of Remaxol in the treatment of various diseases associated with the liver injury: chronic hepatitis B and C, severe ethanol intoxication, drug-induced pathologies due to tuberculosis chemotherapy, leptospirosis, psoriasis, tumor polychemotherapy. The database included information on 2250 patients. The total number of the patients of the control group ($n=1099$) were treated according to the routine schemes (active placebo) and that of the main group ($n=1151$) were additionally treated with Remaxol. Combination of the frequency characteristics of the positive outcomes (% of elimination of the main clinical symptoms and complications) in the patients of the reference groups allowed to estimate the general clinical efficacy of Remaxol, that was equal to 1.75 by the outcome frequency characteristics. The odds ratio of the positive outcomes equaled 5.3 [1.8; 17.0] and the number of the patients needed to treat (NPNT) equaled 8 [6; 14]. Therefore, the infusion Remaxol hepatoprotector based on succinic acid was shown to have statistically and clinically significant therapeutic efficacy in pharmacologic correction of the liver pathologies of diverse genesis.

Key words: Remaxol, metaanalysis, hepatoprotector, succinic acid, drug-associated liver injury, clinical efficacy, odds ratio.

Введение

Ведущей проблемой интенсивной химиотерапии инфекционных и онкологических заболеваний являются лекарственные поражения печени. Их количество неуклонно растёт, что обусловлено развитием фармакотерапевтических технологий и высокими ксенобиотическими нагрузками на организм человека в современном индустриальном мире. Такие поражения печени часто необратимы и ведут к развитию хронических гепа-

титов, цирроза и рака печени, увеличивающих смертность населения [1—4].

Патогенез гепатопатий разного генеза имеет общие черты, включающие гипоксию, дефицит выработки и утилизации АТФ, повреждение мембран гепатоцитов (цитоплазматических и митохондриальных), активизацию свободнорадикального окисления и угнетение антиоксидантной защиты. Поэтому патогенетическая фармакотерапия и профилактика гепатопатологии опираются на устранение одного или нескольких звеньев патогенеза [5—11].

Энергопротекторы метаболитного типа, в состав которых входят митохондриальные субстра-

© Н. К. Мазина, П. В. Мазин, 2015

Адрес для корреспонденции: 610027, г. Киров, ул. Карла Маркса, 112. КГМА

Таблица 1. Общая характеристика публикаций, включённых в метаанализ клинической эффективности Ремаксолола

Ссылка на РКИ	Название верифицированной нозологии в РКИ	Число пациентов в РКИ	Курсовая доза Ремаксолола, мл	Длительность применения, сутки
[18]	Алкогольная патология печени на фоне острого отравления этанолом	130	5600	7
[17]	Лекарственное поражение печени при лечении туберкулёза органов дыхания	146	4000	10
[12]	Хронический гепатит типа С	100	4000	8
[13]	Хронический гепатит типа В и С	494	5200	13
[9]	Неалкогольный стеатогепатит на фоне метаболического синдрома	65	4400	11
[19]	Лекарственное поражение печени при лечении туберкулёза лёгких	90	4000	10
[20]	Псориаз	39	5600	14
[21]	Вирусный гепатит хронический, В и С	90	4000	10
[22]	Токсическая гепатопатология при остром тяжёлом отравлении этанолом	69	4000	10
[23]	Интраоперационная химиотерапия рака желудка	30	1500	3
[24]	Хронический вирусный гепатит, цирротическая стадия	65	4400	11
[25]	Острые отравления этанолом на фоне алкогольного поражения печени	92	5600	7
[26]	Алкогольное поражение печени при остром отравлении этанолом	130	2800	7
[27]	Неалкогольная жировая болезнь печени	108	4400	11
[28]	Местнораспространённый рак слизистой полости рта	182	3200	8
[29]	Первичная форма неалкогольной жировой болезни печени	90	4400	11
[30]	Лептоспироз	90	3600	9
[31]	Цирроз печени	40	3200	8
[32]	Профилактика токсических гепатитов при химиотерапии опухолей	200	2000	5

ты и ко-факторы, участвующие в энергетическом обмене, относятся к высокоэффективным лекарственным средствам с гепатопротекторным действием [6, 12—16]. Среди них выделяют препарат Ремаксол, который позиционируется как многокомпонентный инфузионный гепатопротектор с антиоксидантными, антигипоксантами и мембраностабилизирующими свойствами [10, 13, 16]. В состав Ремаксолола входят естественные энергетические метаболиты (янтарная кислота, рибоксин, никотинамид, метионин) и компоненты (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- и N-метилглюкамин), обеспечивающие необходимую осмолярность и буферную ёмкость [8].

Проявления благоприятного действия Ремаксолола при гепатопатиях разнообразны: усиление эффектов традиционной фармакотерапии, повышение качества жизни пациентов (исчезновение астеновегетативного синдрома, признаков интоксикации, диспепсии), нормализация углеводного, липидного и пигментного обмена, восстановление белоксинтезирующей функции печени, нивелирование признаков цитолиза и холестаза [8—10, 12—15, 17].

Впервые проведённая систематическая оценка результатов 5 рандомизированных клинических исследований эффективности Ремаксолола с уровнем доказательности А [6] показала на статистически достоверное и клинически значимое усиление темпов восстановления функции печени по сравнению с действием препаратов типичной практики.

Новые данные рандомизированных клинических исследований Ремаксолола диктуют необходимость их системной интеграции по качественному (полнота данных, единство дизайна исследования и т. д.) и количественному признаку (возможность

обработки имеющихся данных после перевода их в унифицированную форму и приведения в единую шкалу измерения). Это обеспечит статистическую мощность исследований больше, чем в каждом отдельном случае, за счёт увеличения размера выборки и повысит доказательность и убедительность выводов.

Цель настоящего исследования состояла в объединении новых опубликованных результатов исследований инфузионного гепатопротектора Ремаксолола для более полной количественной оценки величины его клинической эффективности.

Материал и методы

Метаанализ проводили по результатам 19 рандомизированных клинических исследований (РКИ) эффектов Ремаксолола в составе комплексной химиотерапии инфекционных и онкологических заболеваний и при воздействии токсикантов, которые неизменно сопровождалась лекарственным повреждением печени. Источником данных стали публикации (табл. 1) в российских рецензируемых медицинских научных журналах.

Скрининг опубликованных данных проводили с учётом уровня доказательности А, гетерогенности и возможности включения результатов в систематизированный обзор и в единый массив для дальнейшей статистической обработки по методу метаанализа [32—36]. Все исследования имели сходную структуру. Поражения печени были верифицированы и подтверждены биохимическим анализом крови с оценкой активности печеночных ферментов (как отражение глубины поражения печени) — наличия цитолитического (АлАТ, АсАТ) и холестатического (ЩФ, ГГТП) синдромов.

Возраст больных колебался от 18 до 65 лет. Возрастной и гендерный фактор в проявлении клинической эффективности Ремаксолола в публикациях и данном исследовании не учитывались. Курсовая доза препарата, в соответствии с рекомендациями производителя, составила 4040 ± 902 мл, а общая длительность его введения — 10 ± 3 суток.

РКИ проводились по дизайну параллельных симметричных подгрупп, одна из которых (контроль) получала препара-

Таблица 2. Фармакодинамические проявления действия Ремаксола в условиях базисной терапии заболеваний, связанных с поражением печени (в %)

РКИ	Параметр клинической эффективности	ЧИЛ	ЧИК	ПАП	ПОП	ЧБНЛ
[18]	1. Отсутствие делирия	85	66	19	29	5
	2. Отсутствие вторичной пневмонии	97	82	15	18	6
[17]	1. Нормализация значений АлТ	59	40	19	48	5
	2. Нормализация значений АсТ	85	67	18	27	5
[13]	1. Исчезновение синдрома астении	50	32	18	56	5
	2. Исчезновение диспепсии	37	32	5	16	20
	3. Исчезновение желтухи	10	7	3	2	33
	4. Исчезновение гепатомегалии	14	4	10	40	10
[9]	1. Исчезновение диспепсии	53	19	34	179	3
[19]	1. Снижение АлАТ в $\geq 1,5$ раза на 7-е сутки лечения	89	49	40	82	3
	2. Нормализация активности АлАТ при выписке	31	13	18	138	6
	3. Снижение АсАТ в $> 1,5$ раза на 7-е сутки лечения	88	64	24	38	4
	4. Нормализация активности ЩФ при выписке	27	9	18	200	6
	5. Нормализация активности ГГТП при выписке	22	7	15	214	7
	6. Увеличение общего антиоксидантного статуса крови	78	18	60	333	2
[20]	1. Индекс PASI, уменьшение на 50% за 4 недели лечения	90	66	24	36	4
[21]	1. Снижение АлАТ в $\geq 1,5$ раза на 7-е сутки лечения	67	62	5	8	20
	2. Снижение АсАТ в $> 1,5$ раза на 7-е сутки лечения	64	53	11	21	9
	3. Нормализация активности ЩФ при выписке	76	71	5	7	20
	4. Увеличение общей концентрации альбумина на 7-е сутки лечения	42	29	13	45	8
	5. Увеличение эффективной концентрации альбумина на 7 сутки лечения	82	47	35	74	3
	6. Исчезновение тошноты, диспепсии на 2–3-е сутки лечения	77	50	27	54	4
	7. Отсутствие гепатомегалии при выписке	45	27	18	67	6
	8. Снижение общего билирубина на 50% на 7-е сутки лечения	71	55	16	29	6
	9. Снижение прямого билирубина на 50% на 7-е сутки лечения	51	42	9	21	11
	10. Снижение непрямого билирубина на 30% на 7-е сутки лечения	71	55	16	29	6
[22]	1. Исчезновение и отсутствие алкогольного делирия	87	48	39	81	3
[23]	1. Отсутствие осложнений в послеоперационный период	100	81	19	23	5
[24]	1. Исчезновение синдрома астении	57	35	22	63	5
	2. Исчезновение синдрома диспепсии	51	43	8	19	13
	3. Исчезновение боли в правом подреберье	63	38	25	66	4
	4. Исчезновение кожного зуда	37	25	12	48	8
[25]	1. Отсутствие алкогольного делирия	88	70	18	26	6
	2. Отсутствие вторичной пневмонии	94	87	7	8	14
[26]	1. Нормализация АлАТ к 12-му дню терапии	35	22	13	59	8
	2. Нормализация АсАТ к 12-му дню терапии	68	53	15	28	7
	3. Нормализация к 12-му дню терапии общего билирубина	76	64	12	19	8
	4. Уменьшение общего холестерина	82	76	6	8	17
[27]	1. Снижение уровня лактата в 1,9 раза на 3-и сутки лечения	52	15	37	247	3
	2. Отсутствие алкогольного делирия как синдрома отмены	89	66	23	35	4
[28]	1. Отсутствие тошноты	90	80	10	13	10
	2. Отсутствие протеинурии	94	87	7	8	14
	3. Отсутствие стоматита	84	53	31	58	3
	4. Отсутствие боли на 3-и сутки химиотерапии	87	50	37	74	3
	5. Полное заживление на 7-е сутки лечения	93	50	43	86	2
	6. Субъективная высокая оценка терапевтического эффекта	91	25	66	264	2
[29]	1. Отсутствие синдрома астении на 12-е сутки лечения	55	31	24	77	4
	2. Отсутствие диспепсии	97	85	12	14	8
	3. Отсутствие гепатомегалии	88	34	54	159	2
	4. Нормализация АлАТ	32	22	10	45	10
	5. Нормализация АсАТ	65	50	15	30	7
	6. Нормализация общего билирубина	79	56	23	41	4
[30]	1. Отсутствие общей слабости	27	20	7	35	14
	2. Отсутствие лихорадки	93	83	10	12	10
	3. Отсутствие анемии	38	34	4	12	25
	4. Отсутствие лейкоцитоза	81	78	3	4	33
	5. Отсутствие гипербилирубинемии	65	54	11	20	9
[31]	1. Отсутствие астенического синдрома	65	30	35	117	3
	2. Отсутствие диспептических явлений	60	15	45	300	2
	3. Нормализация теста MMSE	70	45	25	56	4
[32]	1. Отсутствие токсического гепатита после химиотерапии опухоли	89	51	38	75	3

Таблица 3. Значения унифицированных параметров клинической эффективности Ремаксола при поражении печени разного генеза

Унифицированный параметр клинической эффективности Ремаксола	Me [95% ДИ]
ЧИЛ, %	71 [43; 94]
ЧИК, %	46 [24; 64]
ПАП, %	21 [12; 34]
ПОП, %	66 [25; 130]
ОШ, отн. ед.	5,3 [1,8; 17,0]
ЧБНЛ, отн. ед.	8 [6; 14]

ты типичной практики (ПТП), действие которых рассматривали как «активное плацебо», другая дополнительно к ПТП получала Ремаксол. Количество пациентов в РКИ, объединённое в базу данных для статистической обработки, составило 2250 (группа Ремаксола — 1151 пациент, группа контроля — 1099 пациентов), что позволило оценивать медикаментозное вмешательство Ремаксолом с точки зрения баланса положительных (полезных) исходов, которые важны для пациентов и отрицательных (бесполезных или опасных).

Гетерогенность групп с разными нозологиями уменьшали переводом обобщённых индикаторов клинической эффективности в единую шкалу измерения путём использования бинарных данных, представленных во всех публикациях: частотных характеристик позитивных исходов в подгруппах сравнения «контроль» — «Ремаксол» (% пациентов с исчезновением основных клинических симптомов, снижением количества осложнений за период наблюдения: ЧИЛ — в группе Ремаксола, ЧИК — в группе контроля). Эффективность Ремаксола количественно представляли унифицированными показателями эффекта вмешательства: ПОП (повышение относительной пользы), ПАП (повышение абсолютной пользы), ОШ (отношение шансов позитивного исхода), ЧБНЛ (число больных, которых необходимо лечить Ремаксолом в течение времени наблюдения, чтобы предотвратить неблагоприятный исход у одного больного) [32—38]

Статистическую обработку объединённых данных проводили с помощью ППП STATISTICA 6,0 [38]. Поскольку тип распределения обобщённых групповых значений показателей в публикациях не определялся, то описательные статистики представляли в формате Me [95% ДИ], где Me — медиана, а [95% ДИ] — 95% доверительный интервал, который вычисляли отдельно для унифицированных показателей клинической эффективности. Статистическую значимость различий оценивали по z-тесту для средних. Вычисление ОШ и 95% доверительных интервалов, а также метаанализ проводили с помощью программы WinPepi [36].

Результаты и обсуждение

Ремаксол в схемах фармакотерапии заболеваний, связанных с поражением печени, способствовал возрастанию значений частотных характеристик позитивных исходов в группах сравнения (табл. 2): во всем диапазоне колебаний значения ЧИЛ статистически превосходили значения ЧИК ($p=0,000..$). С одной стороны, Ремаксол фармакодинамически усиливал действие комплекса традиционных препаратов («активного плацебо»), что проявилось во всех публикациях более быстрым выздоровлением пациентов — уменьшением сроков пребывания больных в стационаре (включая отделение реанимации), с другой — нивелировал проявление неблагоприятных эффектов базисной терапии (противотуберкулёзной, антилептоспирозной, полихимиотерапии). Таким об-

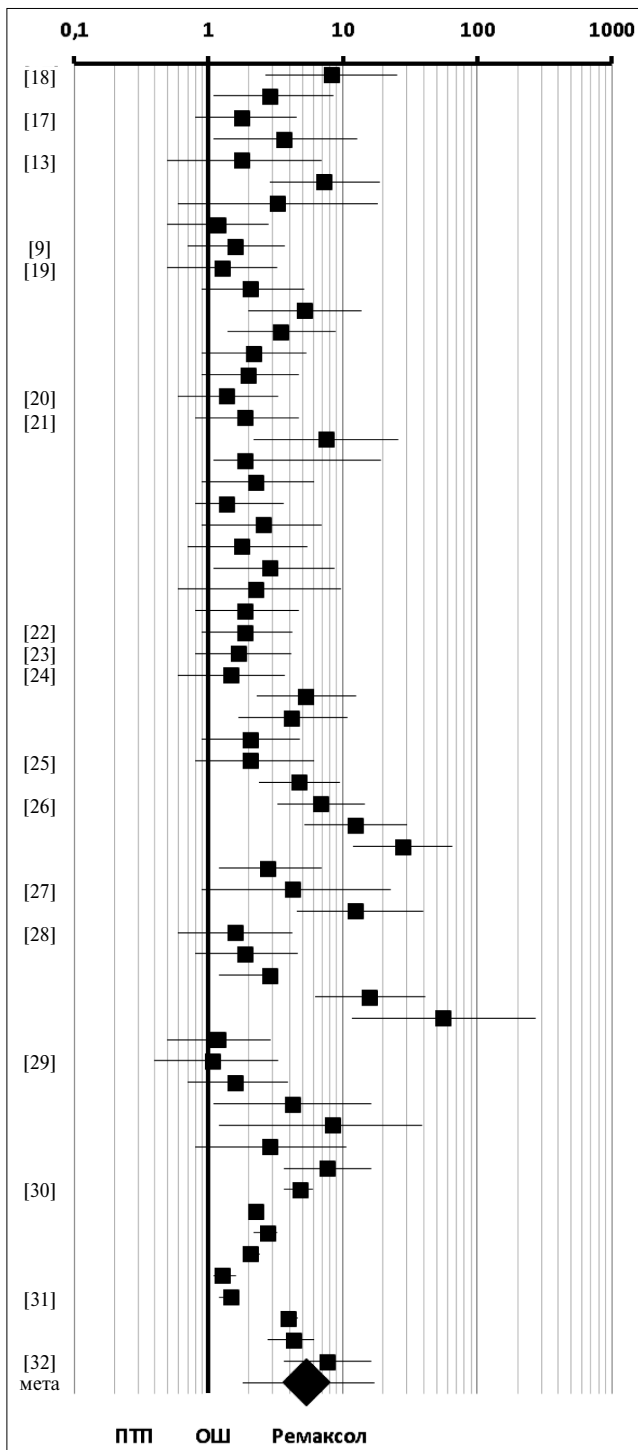
разом, его многократно описанные в литературе гепатопротекторные [13, 14] и универсальные энергопротекторные свойства [6, 8, 10, 12, 19, 21] реализовались в полной мере.

Значения показателей клинической эффективности ПАП и ПОП, вычисленные по изменчивым частотным параметрам позитивного исхода, колебались в широких пределах, что отражало неоднозначные показатели величины и значимости клинического эффекта в зависимости от индикаторного показателя в каждом конкретном РКИ. Однако, несмотря на это, применение Ремаксола в составе традиционной фармакотерапии заболеваний, сопряжённых с поражением печени, можно уверенно и однозначно отнести к эффективной медикаментозной технологии, так как значения показателя ЧБНЛ, характеризующего качество медицинского вмешательства [32—34] по унифицированным параметрам в 80% колебалось в нормированном [32] диапазоне $10 > \text{ЧБНЛ} > 1$.

Таким образом, в отдельных исследованиях, хотя и представлены изменчивые данные, тем не менее они становились сопоставимыми после формализованного перевода в унифицированные параметры клинической эффективности, которые можно объединять. Интегральные оценки клинического эффекта Ремаксола, основанные на объединении частотных характеристик (табл. 3), подавались интерпретации как количественная оценка терапевтического эффекта с учётом нормированных диапазонов значений [32—34].

Интегральные значения Me показателей подтвердили превышение ЧИЛ по отношению к ЧИК в 1,5 раза, превышение нормированного предела 50% значениями ПОП. Интегральные величины ОШ $>1,0$ и ЧБНЛ $10 > \text{ЧБНЛ} > 1$ тоже свидетельствовали не только о существенном проявлении эффекта Ремаксола, но и его клинической значимости и повышении качества медицинского вмешательства.

Обобщённую абсолютную величину эффекта Ремаксола вычисляли как частное от разницы в частоте развития клинических исходов к разбросу данных в группах [32—34, 39, 40]. Усреднённая разница в частоте развития клинических исходов между группами вмешательства и контроля (ПАП) равна 21. Величина стандартного отклоне-



Диапазон изменений отношения шансов (ОШ) наступления позитивного исхода при использовании Ремаксола в составе фармакотерапии различных заболеваний, сопряжённых с поражением печени.

Изменчивость ОШ с 95% ДИ по всем индикаторам эффективности представлена в логарифмическом исчислении, 1 — обозначает нулевой эффект по сравнению с ПТП «активным плацебо»; ПТП — препараты типичной практики, используемые для лечения. По оси абсцисс: — значения десятичного логарифма 95% ДИ ОШ; по оси ординат — ссылки на РКИ пронумерованы как в табл. 1, 2.

ния составляет 12, тогда искомая величина эффекта Ремаксола — $21/12$ равна 1,75. Это значение можно интерпретировать как высокую эффективность, поскольку размер эффекта до 0,2 свидетельствует о слабом эффекте терапии, если он оказывается равным 0,5 — об эффекте средней силы и если он превышает 0,8, то проявляется большой эффект действия препарата [40].

Гетерогенность частотных характеристик эффективности отразилась и на изменчивости показателя ОШ (см. рисунок), который по определению указывает на величину шансов позитивных исходов при использовании Ремаксола. Формализованное графическое представление изменчивости ОШ (точные и интервальные оценки величин эффектов в каждом из включённых в метаанализ исследований) в логарифмической шкале показало, что в ряде исследований, хотя и наблюдались пересечения логарифма 95% ДИ со значением 1,0, то есть — с нулевым эффектом, но при пересчёте на всю выборку пациентов этот феномен исчезал, что свидетельствовало об устойчивости и статистической значимости интегральной оценки эффективности Ремаксола при фармакотерапии поражений печени разного генеза. Отношение шансов (ОШ) наступления позитивного эффекта под действием Ремаксола, по данным метаанализа всех РКИ, включая вариации значений, многократно превышало 1,0 и составило 5,3 [1,8; 17] без пересечения логарифмом нижнего значения 95% ДИ нулевой линии. Это количественно подтвердило разнородные сведения многих авторов о низкой частоте и лёгкой степени побочных эффектов Ремаксола, величина которых значительно ниже, чем частота побочных эффектов в контрольных группах, получавших только базисную терапию как «активное плацебо».

Заключение

Таким образом, интегральные оценки клинической эффективности Ремаксола как гепатопротектора, полученные на основе метаанализа объединённых результатов систематического обзора 14 независимых публикаций, где описаны РКИ сходного дизайна и использовались бинарные показатели исхода, колебались в нормированных пределах и соответствовали критериям клинической и статистической значимости эффекта.

На наш взгляд, это указывает на устойчивость оценок клинической эффективности Ремаксола при лекарственных поражениях печени на фоне интенсивной химиотерапии и позволяет прогнозировать столь же высокий и качественный терапевтический эффект при использовании препарата в условиях разнообразных клинических баз при более гетерогенных поражениях печени у более многочисленных групп пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ушкалова Е.А. Лекарственные поражения печени. Врач 2007; 3: 22–26. / Ushkalova E.A. Lekarstvennyye porazheniya pecheni. Vrach 2007; 3: 22–26. [in Russian]
2. Belentani S., Scaglioni F., Marino M. et al. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. Dig Dis 2010; 28: 155–161.
3. Guzman G., Brunt E.M., Petrovic L.M. et al. Does nonalcoholic fatty liver disease predispose patients to hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis? Arch Pathol Lab Med 2008; 132: 1761–1766.
4. Ong J.P., Pitts A., Younossi Z.M. Increased overall mortality and liver-related mortality in nonalcoholic fatty liver disease. J Hepatol 2008; 49: 608–612.
5. Кожожа Т.Г. Лекарственные средства в фармакотерапии патологии клетки. М.: 2007. / Kozhoka T.G. Lekarstvennyye sredstva v farmakoterapii patologii kletki. M.: 2007. [in Russian]
6. Мазина Н.К., Мазин П.В., Суханов Д.С. Клиническая эффективность сукцинатсодержащего инфузионного препарата при фармакотерапии поражений печени различного генеза по результатам мета-анализа. Тер архив 2013; 1: 56–61. / Mazina N.K., Mazin P.V., Suhanov D.S. Klinicheskaja jeffektivnost' suksinatsoverzhashhego infuzionnogo preparata pri farmakoterapii porazhenij pecheni raznogo geneza po rezul'tatam meta-analiza. Ter arhiv 2013; 1: 56–61. [in Russian]
7. Башинский С.Е. Разработка клинических практических руководств с позиций доказательной медицины. М.: Медиа Сфера, 2004. / Bashinskij S.E. Razrabotka klinicheskikh prakticheskikh rukovodstv s pozicij dokazatel'noj mediciny. M.: Media Sfera, 2004. [in Russian]
8. Пасечник И.Н., Кутепов Д.Е. Печеночная недостаточность: современные методы лечения. М.: МИА, 2009. / Pasechnik I.N., Kutev D.E. Pechenoch'naja nedostatochnost': sovremennyye metody lechenija. M.: MIA, 2009. [in Russian]
9. Романцов М.Г., Сологуб Т.В., Горячева Л.Г. Современный подход к адекватной терапии хронических гепатитов. СПб.: 2010. / Romancov M.G., Sologub T.V., Gorjacheva L.G. Sovremennij podhod k adekvatnoj terapii hronicheskikh gepatitov. SPb.: 2010. [in Russian]
10. Стельмах В.В., Козлов В.К., Радченко В.Г., Некрасова А.С. Патогенетическая терапия метаболического синдрома на стадии органических поражений. Клинический журнал 2012; 6: 45–49. / Stelmah V.V., Kozlov V.K., Radchenko V.G., Nekrasova A.S. Patogeneticheskaja terapija metaboličeskogo sindroma na stadii organnyh porazhenij. Klin med 2012; 6: 45–49. [in Russian]
11. Суханов Д. С., Саватеева Т. Н., Коваленко А. Л. и др. Антиоксидантная активность Ремаксола на модели лекарственного поражения печени. Вестн СПбГМА им. И. И. Мечникова. 2008; 4: 127–132. / Suhanov D. S., Savateeva T. N., Kovalenko A. L. i dr. Antioksidantnaja aktivnost' Remaksola na modeli lekarstvennogo porazhenija pecheni. Vestn SPbGMA im. I. I. Mechnikova. 2008; 4: 127–132. [in Russian]
12. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. Mol Aspects Med. 2000; 21 (3): 49–98.
13. Романцов М.Г., Суханов Д.С., Петров А.Ю., Александрова Л.Н., Сологуб Т.В., Коваленко А.Л., Саватеева-Любимова Т.Н., Емельянова О.Ю. Применение субстратов энергетического обмена при хроническом поражении печени для коррекции метаболических нарушений (экспериментально-клинические исследования). Фундаментал 2011; 3: 131–142. / Romancov M.G., Suhanov D.S., Petrov A.Ju., Aleksandrova L.N., Sologub T.V., Kovalenko A.L., Savateeva-Ljubimova T.N., Emeljanova O.Ju. Primenenie substratov jenergetičeskogo obmena pri hroničeskom porazhenii pecheni dlja korekcii metaboličeskikh narušenij (jeksperimental'no-kliničeskie issledovanija). Fundam issled 2011; 3: 131–142. [in Russian]
14. Сологуб Т.В., Горячева Л.Г., Суханов Д.С., Романцов М.Г. и др. Гепатопротекторная активность Ремаксола при хронических поражениях печени. Клинический журнал 2010; 1: 62–66. / Sologub T.V., Gorjacheva L.G., Suhanov D.S., Romancov M.G., i dr. Gepatoprotekornaja aktivnost' Remaksola pri hronicheskikh porazhenijah pecheni. Klin med 2010; 1: 62–66.
15. Сологуб Т.В., Горячева Л.Г. и др. Гепатопротекторная активность Ремаксола при хронических поражениях печени (материалы многоцентрового рандомизированного плацебо-контролируемого исследования). Вестн СПбГМА им. И.И. Мечникова. 2009; 2: 1–8. / Sologub T.V., Gorjacheva L.G. i dr. Gepatoprotektivnaja aktivnost' Remaksola pri hronicheskikh porazhenijah pecheni (materialy mnogocentrovogo randomizirovannogo placebo-kontroliruemogo issledovanija). Vestn SPbGMA im. I.I. Mechnikova. 2009; 2: 1–8. [in Russian]
16. Стельмах В.В., Радченко В.Г., Козлов В.К. Метаболические корректоры на основе янтарной кислоты как средства патогенетической терапии при хронических вирусных гепатитах. Терапевт. архив. 2011; 2: 67–71. / Sologub T.V., Gorjacheva L.G. i dr. Gepatoprotektivnaja aktivnost' Remaksola pri hronicheskikh porazhenijah pecheni (materialy mnogocentrovogo randomizirovannogo placebo-kontroliruemogo issledovanija). Vestn SPbGMA im. I.I. Mechnikova. 2009; 2: 1–8. [in Russian]
17. Суханов Д.С., Иванов А.К., Романцов М.Г., Коваленко А.Л. Лечение гепатотоксических осложнений противотуберкулезной терапии сукцинатсодержащими препаратами. РМЖ 2012; 6: 22–25. / Suhanov D.S., Ivanov A.K., Romancov M.G., Kovalenko A.L. Lechenie gepatotoksicheskikh oslozhenij protivotuberkuleznoj terapii suksinatsoverzhashchimi preparatami. RMZh 2012; 6: 22–25. [in Russian]
18. Шилов В.В., Шикалова И.А., Васильев С.А., Лоладзе А.Т., Батоцыренов Б.В. Особенности фармакологической коррекции токсических поражений печени у больных с синдромом зависимости от алкоголя и тяжелыми формами острых отравлений этанолом. Журн. неврол. психиатр 2012; 1: 45–48. / Shilov V.V., Shikalova I.A., Vasil'ev S.A., Loladze A.T., Batocyrenov B.V. Osobennosti farmakologičeskoi korekcii toksičeskikh porazhenij pecheni u bol'nyh s sindromom zavisimosti ot alkoholja i tjažhelymi formami ostryh otravlenij jetanolom. Zhurn. nevrol. psihiatr 2012; 1: 45–48. [in Russian]
19. Суханов Д. С., Павлова М. В., Яблонский П. К., Виноградова Т. И. Сравнительная эффективность клинического применения Реамберина, Ремаксола и Адemetионина у больных туберкулезом органов дыхания с лекарственными поражениями печени. Антибиотики и химиотерапия 2013; 58: 1–2: 13–18. / Suhanov D. S., Pavlova M. V., Jablonskij P. K., Vinogradova T. I. Sravnitel'naja jeffektivnost' kliničeskogo primeneniya Reamberina, Remaksola i Ademetionina u bol'nyh tuberkulezom organov dyhanija s lekarstvennymi porazhenijami pecheni. Antibiotiki i himioter 2013; 58: 1–2: 13–18. [in Russian]
20. Грашин Р. А., Теличко И. Н., Заплутанов В. А. Результаты анализа клинической эффективности применения препаратов цитопротективного действия в терапии распространенных форм псориаза. Клинический журнал 2014; 6: 75–78. / Grashin R. A., Telichko I. N., Zaplutanov V. A. Rezul'taty analiza kliničeskoi jeffektivnosti primeneniya preparatov citoprotektivnogo dejstviya v terapii rasprostranennyh form psoriaza. Klin med 2014; 6: 75–78. [in Russian]
21. Павелкина В. Ф., Амплеева Н. П. Сравнительная эффективность гепатотропной активности Ремаксола и эссенциала Н при хронических вирусных гепатитах. Экспериментальная фармакология 2014; 77: 12: 17–21. / Pavelkina V. F., Ampleeva N. P. Sravnitel'naja jeffektivnost' gepatotropnoj aktivnosti Remaksola i jessenciale N pri hronicheskikh virusnyh gepatitah. Jeksperim klin farmakol 2014; 77: 12: 17–21. [in Russian]
22. Шикалова И.А., Колпаков Р.Л., Батоцыренов Б.В. Лечение токсической гепатопатии при острых тяжелых отравлениях этанолом в условиях реанимации. Эффективная терапия 2014; 1: 96–97. / Shikalova I.A., Kolpakov R.L., Batocyrenov B.V. Lechenie toksičeskoi gepatopatii pri ostryh tjažhelyh otravlenijah jetanolom v uslovijah reanimacii. Jefferentnaja ter 2014; 1: 96–97. [in Russian]
23. Хороненко В. Э., Шеметова М. М., Дроздзина О. В., Хомяков В. М. и др. Анастезиологическое обеспечение и интенсивная терапия при проведении гипертермической интраоперационной внутрибрюшной химиотерапии у больных раком желудка. Анастезиол реаниматол 2015; 60: 1: 50–54. / Horonenko V. Je., Shemetova M. M., Drozhzhina O. V. Homjakov V. M. i dr. Anesteziologičeskoe obespečenie i intensivnaja terapija pri provedenii gipertermičeskoi intraoperacionnoj vnutribryušnoj himioterapii u bol'nyh rakom zheludka. Anesteziol reanimatol 2015; 60: 1: 50–54. [in Russian]
24. Стельмах В. В., Козлов В. К., Иванова В. Ф., Самусенко И. А. Эффективность инфузионного гепатотропного препарата Ремаксол в патогенетической терапии хронических вирусных гепатитов на цирротической стадии. Тер архив 2015; 8: 67–72. / Stelmah V. V., Kozlov V. K., Ivanova V. F., Samusenko I. A. Jefferektivnost' infuzionnogo gepatotropnogo preparata Remaksol v patogenetičeskoi terapii hronicheskikh virusnyh gepatitov na cirrotičeskoi stadii. Ter arhiv 2015; 8: 67–72. [in Russian]
25. Ливанов Г. А., Шикалова И. А., Лодягин А. Н., Батоцыренов Б. В. и др. Сравнительная оценка влияния Ремаксола и адemetионина на клиническое течение и динамику показателей углеводного и белкового обмена у больных с острыми отравлениями этанолом на фоне алкогольных поражений печени. Экспериментальная фармакология 2015; 78: 4: 25–28. / Livanov G. A., Shikalova I. A., Lodjagin A. N., Batocyrenov B. V. i dr. Sravnitel'naja ocenka vlijaniya Remaksola i ademetionina na kliničeskoe tečenie i dinamiku pokazatelej uglevodnogo i belkovogo obmena u bol'nyh s ostrymi otravlenijami jetanolom na fone alkohol'nyh porazhenij pecheni. Jeksperim klin farmakol 2015; 78: 4: 25–28. [in Russian]
26. Шилов В. В., Шикалова И. А., Васильев С. А., Батоцыренов Б. В. и др. Коррекция метаболических расстройств в лечении алкогольных поражений печени у больных с острыми отравлениями этанолом. Клинический журнал 2013; 2: 45–48. / Shilov V. V., Shikalova I. A., Vasil'ev S. A., Batocyrenov B. V. i dr. Korekcija metaboličeskikh rasstrojstv v lechenii alkohol'nyh porazhenij pecheni u bol'nyh s ostrymi otravlenijami alkoholem. Klin med 2013; 2: 45–48. [in Russian]
27. Стельмах В. В., Козлов В. К., Баранов В. Л., Латария Э. Л. и др. Энерготропная патогенетически ориентированная терапия сукцинатсодержащими препаратами при неалкогольной жировой болезни печени: перспективы клинического применения. Мед алфавит. Гастроэнтерология 2013; 2: 1: 40–46. / Stelmah V. V., Kozlov V. K., Baranov V. L., Latarija E. L. i dr. Jenergotropnaja patogenetičeskii orientirovannaja terapija suksinatsoverzhashchimi preparatami pri nealkohol'noj zhirovnoj bolezni pecheni: perspektivy kliničeskogo primeneniya. Med alfavit. Gastroenterologija 2013; 2: 1: 40–46. [in Russian]
28. Матякин Г. Г., Иванов В. М., Иванова О. В., Шейкин М. М. Токсико-модифицирующее действие Ремаксола при лечении местнораспространенного рака слизистой полости рта. Стоматология 2013; 92: 6: 12–15. / Matjakin G. G., Ivanov V. M., Ivanova O. V.,

- Shejkin M. M.* Toksiko-modificirujushhee dejstvie Remaksola pri lechenii mestno-rasprostranennogo raka slizistoj polosti rta. *Stomatologija* 2013; 92: 6: 12—15. [in Russian]
29. *Стельмах В. В., Козлов В. К.* Метаболическая коррекция дислипидемии у больных с неалкогольной жировой болезнью печени как новая стратегия терапии. *Тер архив* 2013; 85: 4: 71—76. / *Stel'mah V. V., Kozlov V. K.* Metabolicheskaja korekcija dislipidemii u bol'nyh s nealkogol'noj zhirovoy bolezn'ju pecheni kak novaja strategija terapii. *Ter arhiv* 2013; 85: 4: 71—76. [in Russian]
 30. *Лебедев В. В., Журавлев А. Ю., Зотов С. В., Лебедев П. В. и др.* Применение инфузионного раствора Ремаксол в комплексном лечении больных лептоспирозом. *Тер архив* 2013; 85: 11: 58—61. / *Lebedev V. V., Zhuravlev A. Ju., Zotov S. V., Lebedev P. V. i dr.* Primenenie infuzionnogo rastvora Remaksol v kompleksnom lechenii bol'nyh leptospirozom. *Ter arhiv* 2013; 85: 11: 58—61. [in Russian]
 31. *Заривчацкий М. Ф., Каменских Е. Д., Мугатаров И. Н.* Оценка эффективности применения Ремаксола у больных циррозом печени. *Хирургия*. 2013; 3: 79—82. / *Zarivchackij M. F., Kamenskih E. D., Mugatarov I. N.* Ocenka jeffektivnosti primeneniya Remaksola u bol'nyh cirrozom pecheni. *Hirurgija*. 2013; 3: 79—82. [in Russian]
 32. *Черенков В. Г., Петров А. Б., Васильева Т. М., Строзженков М. М.* Возможности «Ремаксол» для профилактики токсических гепатитов при химиотерапии онкологических больных. *Вопросы онкол* 2013; 59: 3: 369—374. / *Cherenkov V. G., Petrov A. B., Vasil'eva T. M., Strozhenkov M. M.* Vozmozhnosti «Remaksola» dlja profilaktiki toksicheskikh gepatitov pri himioterapii onkologicheskikh bol'nyh. *Voprosy onkol* 2013; 59: 3: 369—374. [in Russian]
 33. *Бащинский С. Е.* Разработка клинических практических руководств с позиций доказательной медицины. М.: Медиа Сфера, 2004. / *Bashhinskij S. E.* Razrabotka klinicheskikh prakticheskikh rukovodstv s pozicij dokazatel'noj mediciny. М.: Медиа Сфера, 2004. [in Russian]
 34. *Власов В. В.* Введение в доказательную медицину. М.: Медиа Сфера, 2001. / *Vlasov V. V.* Vvedenie v dokazatel'nuju medicinu. М.: Медиа Сфера, 2001. [in Russian]
 35. *Зборовский А. Б., Тюренков И. Н.* Осложнения фармакотерапии. М.: Медицина, 2003. / *Zborovskij A. B., Tjurenkov I. N.* Oslozhnenija farmakoterapii. М.: Medicina, 2003. [in Russian]
 36. WinPepi Portal — www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html
 37. *Гринхальх Т.* Основы доказательной медицины. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. / *Grinhal'h T.* Osnovy dokazatel'noj mediciny. М.: GJeOTAR-MED, 2004. [in Russian]
 38. *Реброва О. Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа-Сфера, 2002. / *Rebrova O. Ju.* Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002. [in Russian]
 39. *Cohen J.* Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd. ed. Lawrence Erlbaum Assoc., Hillsdale, NJ. 1988.
 40. *Хазанов В. А.* Фармакологическая регуляция энергетического обмена. *Журн. эксперим клин фармакол* 2009; 72; 4: 61—64. / *Hazanov V. A.* Farmakologicheskaja reguljacija jenergeticheskogo obmena. *Jeksperim klin farmakol* 2009; 72; 4: 61—64. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Мазина Надежда Константиновна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО Кировская государственная медицинская академия Минздрава России, Киров

Мазин Павел Владимирович — ассистент кафедры фармакологии ГБОУ ВПО Кировская государственная медицинская академия Минздрава России, Киров

ЭВОЛЮЦИОНИРУЮЩАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ. ОБЗОР.

**EVOLVING RESISTANCE AMONG GRAM-POSITIVE
PATHOGENS/J. M. MUNITA, A. S. BAYER,
C. A. ARIAS*// CLINICAL INFECTIOUS DISEASES 2015;
61: 2: S48—S57.**

Антимикробная терапия является ключевым компонентом современной врачебной практики и краеугольным камнем при разработке комплексных клинических мер для тяжелобольных. К сожалению, возрастающая проблема устойчивости к антимикробным препаратам в настоящее время представляет основную угрозу, подвергающую риску здоровье тысяч больных во всём мире. Грамположительные патогены демонстрируют чрезвычайно большой генетический арсенал средств адаптации и развития устойчивости фактически ко всем применяемым в клинике антимикробным препаратам. По мере того как всё больше препаратов для преодоления устойчивости при грамположительных инфекциях находятся в распоряжении клиницистов, наблюдается новый виток её эволюции. Таким образом, устойчивость к антимикробным агентам должна рассматриваться как эволюционный процесс, требующий постоянного наблюдения и непрерывных усилий для идентификации появляющихся механизмов устойчивости, чтобы оптимизировать применение антибиотиков и разрабатывать стратегические подходы для решения этой проблемы. В обзоре представлена широкая панорама клинических аспектов антибиотикоустойчивости грамположительных патогенов, сфокусированная на исследовании механизмов, позволяющих данным организмам избежать бактерицидного воздействия обычно применяемых антимикробных средств.

* University of Texas Medical School at Houston, 6431 Fannin St, MSB 2.112, Houston, TX 77030.

УГЛУБЛЁННОЕ ПОНИМАНИЕ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ТРАЕКТОРИЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ У *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*.

**INSIGHTS INTO THE EVOLUTIONARY TRAJECTORIES OF
FLUOROQUINOLONE RESISTANCE IN *STREPTOCOCCUS
PNEUMONIAE*/G. ZHANG, C. WANG, Z. SUI, J. FENG*//
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015;
70: 9: 2499—2506.**

Обычно рост устойчивости *Streptococcus pneumoniae* к фторхинолонам происходит за счёт мутаций в специфических сайтах, но вариационная динамика мутаций в процессе эволюции резистентно-

сти и взаимодействие этих мутаций ещё не достаточно выяснены. Задачей исследования было изучить динамику частоты аллелей у популяций, эволюционирующих под прессингом фторхинолонов, и понять взаимодействие между мутациями, имеющимися в эволюционных траекториях. В результате серийных пассажей в условиях антибиотического прессинга были получены 33 популяции, которые были исследованы секвенированием по методу Paired-End Illumina. Путём трансформации родительского штамма ПЦР фрагментами, содержащими соответствующие мутации, были сконструированы мутанты наблюдаемых эволюционных траекторий. Число мутаций в мишенях, соответствующих фенотипической адаптации к моксифлоксацину (MFX) и левофлоксацину (LVX), прогрессивно возрастало. Для достижения высокого уровня устойчивости к MFX требовалось больше мутаций, чем к LVX. Проникающие взаимодействия, включая положительный эпистаз между мутациями, играют свою роль в направлении эволюции устойчивости к обоим антибиотикам. На примере у двойного мутанта S81F/S79F в *parC* были установлены две мутации (R447C и P454S) в *gyrB*, которые обеспечивали двукратное увеличение устойчивости к MFX и LVX. Кроме того, были установлены динамика частоты аллелей в эволюционирующих популяциях и прямая корреляция с уровнем устойчивости. Клональное взаимодействие между аллелями мутаций вносит свой вклад в динамику эволюции устойчивости на молекулярном уровне. Полученные результаты позволяют по-новому понять направления эволюции устойчивости к фторхинолонам и могут служить теоретической основой для прогнозирования развития устойчивости и разработки стандартов применения этих антибиотиков в клинике.

* State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China.

* Beijing Key Laboratory of Microbial Drug Resistance and Resistome, Beijing 100101, China.

ТЕЙХОБАКТИН, ПЕРВЫЙ АНТИБИОТИК НОВОГО КЛАССА, ОТКРЫТЫЙ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ ICHIP.

**TEIXOBACTIN, THE FIRST OF A NEW CLASS
OF ANTIBIOTICS DISCOVERED BY ICHIP
TECHNOLOGY/L. J. V. PIDDOCK*// JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY
2015; 70: 10: 2679—2680.**

Тейхобактин — недавно описанный антибиотик нового класса, продуцируемый неизвестным ра-

нее почвенным микроорганизмом (временно названным *Eleftheria terrae*). Антибиотик был выделен с помощью нового метода iChip, обеспечивающего рост и образование антибиотика бактерией из окружающей среды, а также его выделение и последующую идентификацию. Тейхобактин был активен в отношении только грамположительных организмов и микобактерий и обладал новым механизмом действия, заключающимся в подавлении биосинтеза пептидогликана. Не было найдено *in vitro* устойчивых к тейхобактину штаммов *Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium tuberculosis*. В экспериментальных инфекциях, вызванных MRSA и *Streptococcus pneumoniae* у мышей, тейхобактин эффективно снижал бактериальную нагрузку. Несмотря на начальную стадию изучения и отсутствие гарантий его продвижения на рынок, использование технологии iChip вселяет надежду на открытие с её помощью новых активных антибиотиков.

* Antimicrobials Research Group, Institute of Microbiology and Infection, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK.

IN VITRO АКТИВНОСТЬ AZD0914, НОВОГО ИНГИБИТОРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК ГИРАЗЫ/ТОПОИЗОМЕРАЗЫ IV, В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИ ВАЖНЫХ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ СО СЛОЖНЫМИ ПИТАТЕЛЬНЫМИ ПОТРЕБНОСТЯМИ ПАТОГЕНОВ.

IN VITRO ACTIVITY OF AZD0914, A NOVEL BACTERIAL DNA GYRASE/TOPOISOMERASE IV INHIBITOR, AGAINST CLINICALLY RELEVANT GRAM-POSITIVE AND FASTIDIOUS GRAM-NEGATIVE PATHOGENS / D. J. BIEDENBACH*, M. D. HUBAND, M. HACKEL, B. L. M. DE JONGE, D. F. SAHM, P. A. BRADFORD// ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY OCTOBER 2015; 59: 10: 6053—6063.

AZD0914, новый спиропиримидинтрионовый ингибитор бактериальной ДНК гиразы, активен в отношении бактериальных видов, обычно выделяемых из проб от инфицированных больных, включая устойчивые к фторхинолонам штаммы. Была оценена *in vitro* активность AZD0914 в отношении глобальной коллекции клинических штаммов основных грамположительных и грамотрицательных со сложными питательными потребностями микроорганизмов, собранных в 2013 г. Была продемонстрирована высокая активность AZD0914 со значениями МПК₉₀, равными 0,25 мг/л, в отношении *Staphylococcus aureus* ($n=11680$) коагулазонегативных стафилококков ($n=1923$), стрептококков ($n=4380$) и *Moraxella catarrhalis* ($n=145$); 0,5 мг/л для *Staphylococcus lug-*

dunensis ($n=120$) и *Haemophilus influenzae* ($n=352$); 1 мг/л для *Enterococcus faecalis* ($n=1241$) и 2 мг/л в отношении *Haemophilus parainfluenzae* ($n=70$). Активность в отношении *Enterococcus faecium* была более ограниченная (МПК₉₀ 8 мг/л). Спектр и высокая активность AZD0914 распространялись на фторхинолоноустойчивые штаммы в каждой видовой группе бактерий, в т.ч. метициллиноустойчивых стафилококков, пенициллиноустойчивых стрептококков, ванкомициноустойчивых энтерококков, образующих бета-лактамазу *Haemophilus* spp., и *M. catarrhalis*. Полученные *in vitro* данные являются основанием для продолжения исследования по применению AZD0914 в отношении разнообразных групп патогенных микроорганизмов.

* International Health Management Associates, Inc., Schaumburg, Illinois, USA.

OP0595, НОВЫЙ ДИАЗАБИЦИКЛООКТАН: МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРА БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ, АНТИБИОТИКА И «УСИЛИТЕЛЯ» БЕТА-ЛАКТАМОВ.

OP0595, A NEW DIAZABICYCLOOCTANE: MODE OF ACTION AS A SERINE β -LACTAMASE INHIBITOR, ANTIBIOTIC AND β -LACTAM 'ENHANCER' / A. MORINAKA*, Y. TSUTSUMI, M. YAMADA, K. SUZUKI, T. WATANABE, T. ABE, T. FURUUCHI, S. INAMURA, Y. SAKAMAKI, N. MITSUNASHI, T. IDA, D. M. LIVERMORE// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 10: 2779—2786.

Образование грамотрицательными бактериями бета-лактамаз во всё возрастающем разнообразии является проблемой для антимикробной химиотерапии. OP0595, независимо открытый Meiji Seika Pharma и Fedora Pharmaceuticals, представляет собой новый диазабициклооктановый ингибитор сериновых бета-лактамаз, а также сам является антибиотиком и независимым от наличия бета-лактамаз «усилителем» бета-лактамов. Ингибиторную активность в отношении сериновых бета-лактамаз и аффинитет к ПСБ определяли соответственно с нитроцефином и боциллином FL. Значение МПК OP0595 одного и в комбинации с бета-лактамами соединениями измеряли в соответствии с рекомендациями CLSI. Морфологические изменения у *Escherichia coli* контролировали фазо-контрастным микроскопированием. При ковалентном связывании с активным центром сериновой СТХ-М-44 и AmpC значения ИК₅₀ OP0595 для бета-лактамаз классов А и С были менее 1000 нМ. Активность OP0595 распространялась на многие энтеробактерии и ассоциирова-

лась с подавлением ПСБ2 и приобретением бактериями сферических форм. Синергизм между OP0595 и бета-лактамами был выражен в отношении штаммов, продуцирующих бета-лактамазы класса А и С, чувствительные к ингибированию. Наконец, OP0595 снижал значения МПК бета-лактамов, мишенью которых были ПСБ3, у мутантного штамма *E.coli*, не образующего бета-лактамазы и устойчивого к действию OP0595, что свидетельствовало о независимом от присутствия бета-лактамаз синергизме, основанном на «усилителе». Таким образом, действие OP0595 происходит в трёх направлениях: 1) подавлении бета-лактамаз классов А и С за счёт ковалентного связывания с их активным центром; 2) антибактериальном действии, выраженном в подавлении ПСБ2 некоторых энтеробактерий; 3) усилении действия бета-лактамов, связывающих другие ПСБ, помимо ПСБ2, на некоторые энтеробактерии. Итак, OP0595 при комбинации с различными бета-лактамами обладает значительным потенциалом для преодоления устойчивости.

* Meiji Seika Pharma Co., Ltd, Yokohama, Japan.

АКТИВНОСТЬ ПОЛИКЕТИДОВ–ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА ПИРАНОНАФТОХИНОНОВ ВИДАМИ *STREPTOMYCES*, ПРОТИВ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЁНОК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

EFFECTIVE ANTIBIOFILM POLYKETIDES AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* FROM THE PYRANONAPHTHOQUINONE BIOSYNTHETIC PATHWAYS OF *STREPTOMYCES* SPECIES /T. OJA*, P. SAN MARTIN GALINDO, T. TAGUCHI, S. MANNER, P. M. VUORELA, K. ICHINOSE, M. METSÄ-KETELÄ, A. FALLARERO* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY OCTOBER 2015; 59: 10: 6046–6052.

Стрептомицеты известны как продуценты биологически активных вторичных метаболитов. В последнее время синтетическая биология получила возможность получать промежуточные и шунтовые соединения с изменённой по сравнению с конечными продуктами метаболизма биологической активностью. Оценивали активность недавно выделенных алнумицинов и других родственных пиранонафтохинонов (ПНХ) поликетидам соединений в отношении биоплёнок *Staphylococcus aureus*. Антимикробную активность соединений в отношении планктонных клеток и биоплёнок измеряли по способности к окрашиванию, базирующейся на окислительно-восстановительном потенциале, а противоблёночную эффективность — по числу жизнеспособных клеток. Был идентифицирован новый противостафилококковый поли-

кетид, алнумицин D, представляющий С-рибозилированный продукт побочного пути обмена, который в отношении планктонных клеток и биоплёнок неожиданно был активнее конечного продукта основного пути обмена алнумицина А, у которого рибозильный остаток был превращён в диоксановую группу. Оценка активности других алнумицинов в отношении планктона и биоплёнок показала, что наличие остатка рибозы в пиранозной форме важна для проявления высокой активности против зрелых биоплёнок. Кроме того, была определена противоблёночная активность других близко родственных ПНХ поликетидам соединений. На основании ранее опубликованных данных об активности против планктонных клеток *S.aureus* для тестирования против зрелых биоплёнок. были отобраны гранатицин В, калафунгин и медермицин, из которых гранатицин В был наиболее активным. Наиболее активные в отношении биоплёнок алнумицин D и гранатицин В обладали рядом структурных черт, которые могут быть важны для проявления противоблёночной активности, как-то отсутствие заряда, гликозилирование, наличие сходного типа оксигенации латерального нафтохинонового кольца. Полученные данные подчёркивают возможности использования пула промежуточных продуктов биосинтеза антибиотиков как источника эффективных противоблёночных соединений.

* Pharmaceutical Sciences Laboratory, Faculty of Science and Engineering, Åbo Akademi University, Turku, Finland.

* Division of Pharmaceutical Biosciences, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

ФАРМАКОКИНЕТИКА/ФАРМАКОДИНАМИКА КОМБИНАЦИИ БЕТА-ЛАКТАМА И ИНГИБИТОРА БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ: НОВЫЙ ПОДХОД К АЗТРЕОНАМУ/АВИБАКТАМУ.

PHARMACOKINETICS/PHARMACODYNAMICS OF A β -LACTAM AND β -LACTAMASE INHIBITOR COMBINATION: A NOVEL APPROACH FOR AZTREONAM/AVIBACTAM /R. SINGH*, A. KIM, M. A. TANUDRA, J. J. HARRIS, R. E. MCLAUGHLIN, S. PATEY, J. P. O'DONNELL, P. A. BRADFORD, A. E. EAKIN // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 9: 2618–2626.

Активность комбинации азтреонам/авибактам представляется перспективной в отношении грамотрицательных патогенов с мультитекарственной устойчивостью, продуцирующих металло- β -лактамазы (МБЛ), например, New Delhi MBL-1 (NDM-1). Понимание фармакокинетики/фармакодинамики (ФК/ФД) является в клинике основным

критерием при выборе оптимального дозирования. Настоящее исследование нацелено на выработку дополнительного ФК/ФД подхода при назначении азтреонама/авибактама применительно ко многим клиническим штаммам Enterobacteriaceae. Исследовали 6 клинических штаммов энтеробактерий, экспрессирующих МБЛ и бета-лактамазы расширенного спектра, на *in vitro* модели инфекции с использованием диализных мембран (HFIM) при различных режимах дозирования, имитирующих ФК азтреонама/авибактама у человека. Результаты, полученные для 2 штаммов, были проверены на *in vivo* модельной инфекции бедра нейтрогенических мышей. Значения МПК комбинации у штаммов варьировало в пределах 0,125–8 мг/л. При инфузии с постоянной концентрацией авибактама, равной 4 мг/л, индекс ФК/ФД для азтреонама был выражен как % $fT > MIC$. При использовании фиксированной дозы азтреонама эффективность авибактама лучше всего коррелировала с величиной (%) времени превышения критической пороговой концентрации, равной 2–2,5 мг/л. Эти результаты хорошо соотносились с эффективностью, наблюдаемой на модельной инфекции бедра у мыши, и подтверждали в условиях *in vivo* значение ФК/ФД, полученное в опытах *in vitro*. Судя по оценке значений ФК/ФД азтреонама/авибактама, полученных на *in vitro* модельной инфекции (HFIM), допустимо применение единого подхода для штаммов с широким кругом значений МПК. Данный дополнительный подход можно легко применить для прогнозирования эффективных клинических доз комбинаций бета-лактамов с ингибиторами бета-лактамаз.

* AstraZeneca Infection Innovative Medicines, 35 Gatehouse Drive, Waltham, MA 02451, USA.

ЦЕФТОЛОЗАН/ТАЗОБАКТМ И ЦЕФТАЗИДИМ/АВИБАКТМ: ДВЕ НОВЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ БЕТА-ЛАКТАМА И ИНГИБИТОРА БЕТА-ЛАКТАМАЗ ПРИ ИНФЕКЦИЯХ, ВЫЗВАННЫХ УСТОЙЧИВЫМИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ. ОБЗОР.

CEFTOLOZANE/TAZOBACTAM AND CEFTAZIDIME/AVIBACTAM: TWO NOVEL β -LACTAM/ β -LACTAMASE INHIBITOR COMBINATION AGENTS FOR THE TREATMENT OF RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIAL INFECTIONS/ J.L. LISCI, M. V. MAHONEY, E. B. HIRSCH// INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2015, 46: 3: 266–271.**

Рост числа устойчивых грамотрицательных бактерий является основным тревожным фактором, приводящим к трудностям лечения инфекций, обусловленных мультирезистентными бактериями.

Две недавно предложенные антибиотические комбинации могут быть эффективными при лечении подобных инфекций: нового цефалоспоринового цефтолозана с известным ингибитором бета-лактамаз (ИБЛ) тазобактамом и нового ИБЛ авибактама с зарекомендовавшим себя цефалоспорином цефтазидимом. Обе комбинации антибиотика с ИБЛ оставались активными *in vitro* в отношении устойчивых грамотрицательных патогенов, включая Enterobacteriaceae и *Pseudomonas aeruginosa*. Примечательно, что цефтазидим/авибактам продемонстрировал устойчивую активность в отношении продуцентов карбапенемазы *Klebsiella pneumoniae* (КРС). Обе комбинации рекомендованы к назначению при осложнённых инфекциях мочевого тракта и интраабдоминальных (с метронидазолом) инфекциях и находятся на III фазе испытаний при вентилляторно-ассоциированной и внутрибольничной пневмонии. Обзор охватывает последние данные о спектре активности комбинаций и клинических испытаниях, ставших основанием для их одобрения FDA (US Food and Drug Administration). Оба препарата хорошо переносятся больными и перспективны при инфекциях, обусловленных мультирезистентными грамотрицательными патогенами.

* Department of Pharmacy and Health Systems Sciences, Northeastern University, 360, Huntington Avenue, R218TF, Boston, MA02115, USA.

СИНЕРГИДНЫЙ БАКТЕРИЦИДНЫЙ ЭФФЕКТ КОМБИНАЦИИ ДВУХ «СТАРЫХ» АНТИБИОТИКОВ ПОЛИМИКСИНА В И ХЛОРАМФЕНИКОЛА В ОТНОШЕНИИ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ NDM.

SYNERGISTIC KILLING OF NDM-PRODUCING MDR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* BY TWO 'OLD' ANTIBIOTICS-POLYMYXIN B AND CHLORAMPHENICOL / N. A. RAHIM, S.-E. CHEAN, M. D. JOHNSON, H. YU, H. E. SIDJABAT, J. BOYCE, M. S. BUTLER, M. A. COOPER, J. FU, D. L. PATERSON, R. L. NATION, P. J. BERGEN, T. VELKOV, J. LI// JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015; 70: 9: 2589–2597.**

Комбинированная терапия — очень важная альтернатива в борьбе с грамотрицательными мультирезистентными возбудителями. В настоящем исследовании системно была изучена бактерицидность и возникновение устойчивости к полимиксину В при использовании комбинации полимиксина В и хлорамфеникола в отношении 4 мультирезистентных (MDR) штаммов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих нью-дельийскую металло-бета-лактамазу (NDM). Присутствие генов, обуславливающих устойчивость к хлорамфе-

николу, устанавливали с помощью ПЦР. В исследовании бактерицидности (time-kill studies) с инокуломом 10^6 КОЕ/мл использовали клинические релевантные концентрации каждого антибиотика (в пределах: полимиксин В 0,5–2 мг/л; хлорамфеникол 4–32 мг/л), анализируя в реальном времени исходный и 24-часовой профиль популяции. Микробиологический отклик определяли методом изменения log и моделированием фармакодинамики в сочетании со сканирующим электронным микроскопированием. (СЭМ). У всех штаммов были выявлены многочисленные гены, кодирующие помповый выброс и обеспечивающие устойчивость к хлорамфениколу. Монотерапия полимиксином В при всех концентрациях вызывала быструю гибель бактерий с последующим быстрым вторичным ростом и возникновением устойчивости к полимиксину В. Монотерапия хлорамфениколом была неэффективной. Комбинированная терапия значительно снижала вторичный рост, синергидный эффект наблюдался в 25 из 28 вариантов на 6 и 24 ч. В 15 из 28 вариантов комбинаций на 24 ч у всех испытанных штаммов не было обнаружено жизнеспособных клеток. При комбинированной терапии не было выявлено устойчивых к полимиксину бактерий. Эти результаты были подтверждены при фармакодинамическом моделировании. С использованием СЭМ были показаны значительные морфологические изменения клеток после обработки как одним полимиксином В, так и комбинацией антибиотиков. Таким образом, комбинация полимиксина В и хлорамфеникола оказывала усиленный бактерицидный эффект на NDM-продуцирующую MDR *K.pneumoniae* и подавляла возникновение устойчивости к полимиксину.

* Drug Delivery, Disposition and Dynamics, Monash Institute of Pharmaceutical Sciences, Monash University, Melbourne, Victoria, Australia.

МОЖЕТ ПЛАЗОМИЦИН ОДИН ИЛИ В КОМБИНАЦИИ БЫТЬ ПРЕПАРАТОМ ВЫБОРА ПРОТИВ УСТОЙЧИВОГО К КАРБАПЕНЕМАМ *ACINETOBACTER BAUMANNII*?

CAN PLAZOMICIN ALONE OR IN COMBINATION BE A THERAPEUTIC OPTION AGAINST CARBAPENEM-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII*? /C. GARCÍA-SALGUERO, I. RODRÍGUEZ-AVIAL, J. J. PICAZO, E. CULEBRAS*// ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY OCTOBER 2015; 59: 10: 5959–5966.

Госпитальные патогены могут вызывать различные инфекции, особенно в отделениях интенсивной терапии и у больных с ослабленным иммунитетом. Обычно такие возбудители устойчивы ко

многим лекарствам, что создаёт проблемы в лечении. Одним из самых часто встречающихся патогенов в клинических условиях является *Acinetobacter baumannii*. При инфекциях, вызванных лекарственно-устойчивыми грамотрицательными бактериями, обычно применяют карбапенемы, но повсеместно наблюдается рост устойчивости к ним. Тяжелобольным часто назначают эмпирическую комбинированную терапию соответствующим бета-лактамом и аминогликозидом. Задачей исследования было оценить *in vitro* активность плазомицина в отношении устойчивого к карбапенемам *A.baumannii*. Антибиотиком сравнения был амикацин. Активность плазомицина в комбинации с различными антибиотиками определяли методами: диско-диффузионным, шахматной доски и оценки бактерицидного действия во времени (time-kill studies). Синергидный эффект был отмечен у комбинаций карбапенемов (меропенем и/или имипенем) с плазомицином и амикацином. При комбинации амногликозидов с антибиотиками других классов в некоторых случаях был отмечен синергизм, зависящий от штамма и антибиотиков, входящих в комбинацию; важно, что ни в одном случае не было отмечено антагонизма. Полученные результаты свидетельствуют о возможном использовании плазомицина в комбинации с другими антибиотиками (в основном карбапенемами) при инфекциях, вызванных *A.baumannii*, включая устойчивые к карбапенемам штаммы.

* Microbiology Department, Hospital Clinico San Carlos, Madrid, Spain.

ТРИМЕТОПРИМ/СУЛЬФАМЕТОКСАЗОЛ ПРОТИВ *ACINETOBACTER* SPP.: ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ.

TRIMETHOPRIM/SULFAMETHOXAZOLE FOR *ACINETOBACTER* SPP.: A REVIEW OF CURRENT MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL EVIDENCE/ M. E. FALAGAS*, K. Z. VARDAKAS, N. S. ROUSSOS// INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2015; 46: 3: 231–241.

В настоящее время врачи поставлены перед проблемой эпидемических инфекций, обусловленных мультирезистентным *Acinetobacter*, и вынуждены рассматривать любую терапевтическую альтернативу, включая более старые, обычно не применяемые антибиотики. Целью обзора было оценить опубликованные данные об антимикробной активности и клинической эффективности триметоприм/сульфаметоксазола (ТМП/СМЗ) в отношении *Acinetobacter* spp. Включённые в обзор *in vitro* исследования содержат данные надзорных

отчётов, микробиологические исследования, относящиеся к активности ТМП/СМЗ, и клинические исследования, опубликованные после 2000 г. По данным надзорных исследований, показатель нечувствительности *Acinetobacter* spp., был в пределах от 4 до 98,2%, в 23 из 28 исследований нечувствительность к ТМП-СМЗ превышала 50%, а в 15 работах была более 70%. В исследованиях, касающихся MDR *Acinetobacter* spp., уровень нечувствительности составлял 5,9—100%, в 19 из 21 работ сообщается о более чем 70% нечувствительности. Группа штаммов *Acinetobacter baumannii* с экстенсивной лекарственной устойчивостью (XDR) обладала полной (100%) устойчивостью (данные 5/6 исследований). Устойчивые к карбапенемам штаммы *Acinetobacter* spp. были более чем на 80% нечувствительны к ТМП/СМЗ (22/26 исследований). В одном исследовании полимиксиноустойчивого *A. baumannii* показатель чувствительности равнялся 54% (13/24). Сообщается только о 7 случаях оценки ТМП/СМЗ при *Acinetobacter* spp. инфекциях, главным образом в комбинациях с другими антибиотиками, результаты которых были успешными. Несмотря на то что ТМП/СМЗ, как правило, неактивен в отношении *Acinetobacter* spp., его можно принимать во внимание в случаях, когда нет другого выбора.

* Alfa Institute of Biomedical Sciences, 9 Neapoleos Street, 15123, Marousi, Athens, Greece.

ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИИ ФОСФОМИЦИН-ТОБРАМИЦИН В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПО ДИНАМИКЕ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ (TIME-KILL ASSAY) И КОНЦЕНТРАЦИЯМ, ПРЕДОТВРАЩАЮЩИМ МУТАЦИИ.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF FOSFOMYCIN-TOBRAMYCIN COMBINATION AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES ASSESSED BY TIME-KILL ASSAYS AND MUTANT PREVENTION CONCENTRATIONS / M. DÍEZ-AGUILAR, M. I. MOROSINI*, A. P. TEDIM, I. RODRÍGUEZ, Z. AKTAS, R. CANTÓN // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY OCTOBER 2015; 59: 10: 6039—6045.

На 8 клинических штаммах *Pseudomonas aeruginosa*, принадлежащих к популяции дикого типа по фосфомицину, ФСМ, (МПК 64 мкг/мл) и с различной чувствительностью к тобрамицину, ТБМ, (МПК 1—64 мкг/мл), определяли антибактериальную активность комбинации ФСМ-ТБМ по динамике гибели клеток (time-kill assay). У 5 из этих штаммов (МПК ТБМ 1—64 мкг/мл) была определена концентрация, предотвращающая образование мутантов (КПМ), и «окно се-

лекции мутантов» (ОСМ) в аэробных и анаэробных условиях, имитирующих условия при инфекциях, сопровождающихся образованием биоплёнок. Комбинация ФСМ-ТБМ обладала синергидным бактерицидным действием в отношении штаммов, несущих мутации в репрессорном гене *texZ* и имеющих МПК ТБМ, равную 4 мкг/мл. Подобный эффект не наблюдали у штаммов с МПК 1—2 мкг/мл из-за сильного бактерицидного действия ТБМ. В аэробных и анаэробных условиях значения КПМ фосфомицина были выше, чем тобрамицина (2048 мкг/мл и выше против 16—256 мкг/мл). Интересно, что это ассоциировалось с узкими или нулевыми значениями ОСМ в аэробных и анаэробных условиях. Синергидный эффект комбинации (данные «time-kill» исследований) в отношении высокоустойчивых к ТБМ штаммов, продуцирующих аминокликозид нуклеотидилтрансферазы, отсутствовал, а ОСМ было широким в обоих условиях. В ходе исследования КПМ у чувствительных к ФСМ штаммов дикого типа и мутантов *P. aeruginosa*, полученных в экспериментах по определению КПМ, были обнаружены мутации в *glpT* гене, ответственные за устойчивость. Все мутанты имели изменения в GlpT аминокислотной последовательности, результатом которых была усечённая пермеаза, обеспечивающая устойчивость к ФСМ. Можно полагать, что комбинация ФСМ-ТБМ может быть альтернативой при инфекциях, вызванных *P. aeruginosa*, поскольку продемонстрировала синергидную и бактерицидную активность в отношении штаммов, чувствительных и с низким уровнем устойчивости к ТБМ, а также предотвращала появление устойчивых мутантов в аэробных и анаэробных условиях.

* Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain.

* Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

IN VITRO СИНЕРГИДНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА НОВИЦИДИНА С РИФАМПИНОМ, ЦЕФТРИАКСОНОМ И ЦЕФТАЗИДИМОМ В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ К АНТИБИОТИКАМ ENTEROBACTERIACEAE.

ANTIMICROBIAL PEPTIDE NOVICIDIN SYNERGIZES WITH RIFAMPIN, CEFTRIAXONE, AND CEFTAZIDIME AGAINST ANTIBIOTIC-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE / O. SOREN*, K. SIDELMANN BRINCH, D. PATEL, Y. LIU, A. LIU, A. COATES, Y. HU* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY OCTOBER 2015; 59: 10: 6233—6240.

Распространение устойчивости грамотрицательных бактерий к антибиотикам представляет серьёзную угрозу, а инфекции, вызванные такими микроорганизмами, повсеместно являются основной причиной смертности. Традиционный подход к разработке новых лекарств неизбежно ведёт к появлению новых устойчивых штаммов, что делает новые лекарства неэффективными. Восстановление терапевтического потенциала существующих антибиотиков является весьма привлекательной новой стратегией. Новицидин, новый катионный антимикробный пептид, эффективный против грамотрицательных бактерий, был исследован в качестве «усилителя» антибиотиков. Действие комбинаций его с рифампином, цефтриаксоном и цефтазидимом было апробировано на 94 антибиотикоустойчивых клинических штаммах грамотрицательных бактерий и 7 штаммах-продуцентах NDM-1 бета-лактамазы. Методом шахматной доски было показано синергидное взаимодействие новицидина с рифампином в отношении более 70% штаммов и значительное снижение МПК. Комбинации новицидина с цефтриаксоном и цефтазидимом проявили синергидный эффект в отношении 89,7% штаммов, устойчивых к цефтриаксону, и 94,1% штаммов, устойчивых к цефтазидиму. Полученные результаты были подтверждены исследованиями динамики гибели клеток у многих штаммов. Более того, при комбинациях новицидина с рифампином и цефтриаксоном увеличивался постантибиотический эффект. Выявление деполяризации мембран показало, что новицидин нарушает заряд цитоплазматических мембран грамотрицательных бактерий. *In vitro* токсикологические тесты показали низкую гематолитическую активность новицидина и отсутствие негативного действия на культуры клеток. Таким образом, было *in vitro* продемонстрировано «обновление» терапевтического потенциала цефтриаксона и цефтазидима в отношении грамотрицательных бактерий и усиление активности рифампина. Данная стратегия может найти большое применение в клинике в рамках общей борьбы с антибиотикоустойчивыми возбудителями инфекций.

* Institute for Infection and Immunity, St George's, University of London, London, United Kingdom.

СИНЕРГИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕМБРАНО-АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ, ПОЛИМИКСИНА В И ГРАМИЦИДИНА С, НА MDR ШТАММЫ И БИОПЛЁНКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

SYNERGISTIC EFFECT OF MEMBRANE-ACTIVE PEPTIDES POLYMYXIN B AND GRAMICIDIN S

ON MULTIDRUG-RESISTANT STRAINS AND BIOFILMS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* / M. BERDITSCH, T. JÄGER, N. STREMPPEL, T. SCHWARTZ, J. OVERHAGE, A. S. ULRICH* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY SEPTEMBER 2015; 59: 9: 5288—5296.

Pseudomonas aeruginosa с множественной лекарственной устойчивостью (MDR) является основным возбудителем тяжёлых госпитальных инфекций. В настоящее время полимиксин В (ПМВ), несмотря на нежелательные побочные эффекты, является последним средством при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Синергидный эффект комбинаций лекарств позволяет снизить необходимые терапевтические дозы и, следовательно, их токсичность. Исследовали синергидное взаимодействие двух циклических антимикробных пептидов, ПМВ и грамицидина S (ГС) в отношении различных штаммов *P. aeruginosa*, используя количественный метод шахматной доски и диазорезорцин в качестве индикатора роста. Из 28 исследованных штаммов у 20 был показан отчётливый синергидный эффект, индекс фракционной ингибиторной концентрации (ИФИК) был $\leq 0,5$. Надо заметить, что синергидный эффект не был выявлен в отношении некоторых клинических штаммов *P. aeruginosa*, росших в виде мелких колоний, имевших ИФИК в пределах $>0,5$ — $\leq 0,70$. Кроме подавления роста планктонных клеток, комбинация пептидов значительно снижала рост биоплёнки по сравнению с обработкой индивидуальными пептидами. При обработке зрелых биоплёнок комбинацией ПМВ и ГС был отмечен более быстрый и продолжительный эффект на их метаболическую активность, чем при действии отдельными пептидами. Итак, установлено синергидное взаимодействие двух циклических мембрано-активных пептидов в отношении 17 MDR штаммов *P. aeruginosa* и биоплёнок *P. aeruginosa* PAO1. Использование комбинации ПМВ и ГС представляет многообещающую перспективу при местном применении и профилактике острых и хронических инфекций, вызванных MDR и плёнкообразующими штаммами *P. aeruginosa*.

* Institute of Organic Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany.

* Institute of Biological Interfaces, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany.

КОМБИНАЦИЯ ПОЛИМИКСИНА В С НЕДОСТАТОЧНО *IN VITRO* АКТИВНЫМИ АНТИМИКРОБНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ПРОТИВ МОНОТЕРАПИИ ПОЛИМИКСИМОМ В ТЯЖЁЛОБОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИЯМИ *ACINETOBACTER BAUMANNII* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

POLYMYXIN B IN COMBINATION WITH ANTIMICROBIALS LACKING *IN VITRO* ACTIVITY VERSUS POLYMYXIN B IN MONOTHERAPY IN CRITICALLY ILL PATIENTS WITH *ACINETOBACTER BAUMANNII* OR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INFECTIONS / M. H. RIGATTO, F. J. VIEIRA, L. C. ANTOCHEVIS, T. F. BEHLE, N. T. LOPES, A. P. ZAVASCKI* // **ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY** OCTOBER 2015; 59: 10: 6575—6580.

Отсутствуют клинические данные о применении полимиксина В (ПМВ) в комбинации с другими антимикробными препаратами при лечении инфекций, обусловленных штаммами *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* с экстенсивной лекарственной устойчивостью (XDR). Было выполнено когортное исследование на больных отделений интенсивной терапии двух университетских клиник, чтобы оценить лечение тяжёлых *A.baumannii* и *P.aeruginosa* инфекций в/в ПМВ в течение ≥ 48 час. Варианты, ассоциированные с 30-суточной смертностью, оценивали с помощью модели пропорциональных рисков по Коксу. Всего в исследование был включён 101 больной; 33 (32,7%) больных лечили комбинацией ПМВ и антимикробных препаратов с недостаточной *in vitro* активностью, 68 (67,3%) — только ПМВ. В среднем показатель 30-суточной смертности составил 59,4% (60 больных), или 42,4% (14/33) и 67,6% (46/68) в группах комбинированной и монотерапии, соответственно ($p=0,03$). Комбинированная терапия независимо ассоциировалась с более низким показателем 30-суточной смертности (отношение рисков 0,33; 95% ДИ 0,17—0,64; $p=0,001$). Клиренс креатинина ≥ 60 мл/мин также был защитным фактором, тогда как показатель острого и хронического физиологического состояния (APACHE II) и полимикробная инфекция ассоциировались с повышенной смертностью. После введения в модель выше изложенных положительных тенденций комбинированной терапии результаты не изменились. Защитный эффект имел место только для комбинаций с бета-лактамами или карбапенемами и в двух подгруппах больных: с *A.baumannii* инфекциями и инфекциями нижних дыхательных путей. Это первое клиническое исследование, показавшее преимущество комбинированной терапии над монотерапией ПМВ тяжёлых инфекций, вызванных XDR-устойчивыми штаммами *A.baumannii* и *P.aeruginosa*.

* Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

* Department of Internal Medicine, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

МИКРОБИОМ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА КАК ПЕРЕНОСЧИК ГЕНОВ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ МЕЖДУ КОНТИНЕНТАМИ.

THE HUMAN GUT MICROBIOME AS A TRANSPORTER OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES BETWEEN CONTINENTS/J. BENGTSSON-PALME, M. ANGELIN, M. HUSS, S. KJELLQVIST, E. KRISTIANSSON, H. PALMGREN, D. G. J. LARSSON, A. JOHANSSON* // **ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY** OCTOBER 2015; 59: 10: 6551—6560.

Предшествующие исследования по распространению антибиотикоустойчивости путешественниками ограничивались избранным кругом культивируемых видов бактерий, упуская большую часть микробиома человека. Было выполнено метагеномное секвенирование случайной массивированной выборки клонированных фрагментов ДНК (shotgun method, дробление генома), позволяющее одновременно выявить более 300 генов антибиотикоустойчивости в фекальных пробах, отобранных у 35 шведских студентов до и после пребывания на Индийском полуострове и в Центральной Африке по обменной программе. Все пробы дополнительно культивировали для выявления энтеробактерий, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), и последующего секвенирования генома. В целом таксономическое разнообразие и состав микробиома кишечника оставались стабильными до и после поездки, но у 23/35 студентов было повышенное количество *Proteobacteria*. Относительное содержание генов антибиотикоустойчивости возросло в большинстве случаев генов, кодирующих устойчивость к сульфонамидам (в 2,6 раза), триметоприму (7,7 раз) и бета-лактамам (2,6 раза). Очень важно, что отмеченное увеличение наблюдалось при отсутствии какого-либо потребления антибиотиков. Из 18 студентов, посетивших Индийский п-ов, 12 приобрели БЛРС-продуцирующую *Escherichia coli*, чего не было у вернувшихся из Африки. Несмотря на попытки глубокого секвенирования, чувствительность метагенома не была достаточной, чтобы обнаружить приобретение мало распространённых генов, ответственных за данный БЛРС фенотип. Таким образом, метагеномное секвенирование кишечного микробиома шведских студентов, вернувшихся из Центральной Африки и Индийского п-ва, показало повышенное количество генов, кодирующих устойчивость к широко применяемым антибиотикам.

* Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden, Department of Clinical Microbiology, Bacteriology, Umeå University, Umeå, Sweden.

**ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ИЗЫСКАНИЯ
АНТИГРИБКОВЫХ ЛЕКАРСТВ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ
ПРИ ИЗУЧЕНИИ РОСТА И ВИРУЛЕНТНОСТИ
CANDIDA ALBICANS. ОБЗОР.**

**POTENTIAL TARGETS FOR ANTIFUNGAL DRUG
DISCOVERY BASED ON GROWTH AND VIRULENCE
IN *CANDIDA ALBICANS* / X. LI, Y. HOU, L. YUE, S. LIU,
J. DU, S. SUN* // ANTIMICROBIAL AGENTS
CHEMOTHERAPY OCTOBER 2015; 59: 10: 5885—5891.**

Грибковые инфекции, особенно вызванные *Candida albicans*, остаются клинической проблемой. Несмотря на разработку более эффективных противогрибковых лекарств, их применение ограничено по разным причинам. Необходимы альтернативные стратегии лечения, нацеленные на новые мишени *Candida albicans*. Изучение процессов роста и вирулентности гриба важно не только для понимания патогенного механизма, но и для идентификации возможных мишеней. В обзоре представлены данные о механизмах роста и вирулентности *C. albicans* и определены возможные мишени для изыскания новых противогрибковых препаратов.

* Department of Pharmacy, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Shandong Province, People's Republic of China.

**IN VIVO СТУПЕНЧАТОЕ РАЗВИТИЕ
МУЛЬТИЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К АЗОЛУ,
ЭХИНОКАНДИНУ И АМФОТЕРИЦИНУ В У *CANDIDA
ALBICANS*, СОПРОВОЖДАЕМОЕ МНОЖЕСТВЕННЫМИ
ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ.**

**STEPWISE EMERGENCE OF AZOLE, ECHINOCANDIN
AND AMPHOTERICIN B MULTIDRUG RESISTANCE /
IN VIVO IN *CANDIDA ALBICANS* ORCHESTRATED BY
MULTIPLE GENETIC ALTERATIONS / R. H. JENSEN,
K. M. THYSEN ASTVAD, L. V. SILVA, D. SANGULARD,
R. JØRGENSEN, K. F. NIELSEN, E. G. MATHIASSEN,
G. DORODIAN, D. S. PERLIN, M. C. ARENDRUP* //
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2015;
70: 9: 2551—2555.**

Задачей исследования было охарактеризовать молекулярные механизмы ступенчатого развития множественной лекарственной устойчивости у

последовательно выделяемых клинических штаммов *Candida albicans* от одного и того же больного. Методами EUCAST EDef 7.2 и Етест была протестирована чувствительность 9 клинических штаммов (от P-1 до P-9), и штаммы P-4, P-5, P-7 и P-9 были отобраны для дальнейших исследований. Их родственность определяли мультилокусным сиквенс-типированием (MLST). Дополнительные гены анализировали секвенированием (включая *FKS1*, *ERG11*, *ERG2* и *TAC1*), генную экспрессию — количественной ПЦР (*CDR1*, *CDR2* и *ERG11*), стерины — газовой хроматографией-масс-спектрометрией и УФ-спектрометрией. *In vivo* вирулентность определяли на модельной инфекции у насекомых (*Galleria mellonella*) и оценивали тестированием и с помощью логарифмического ряда Mantel—Cox. Штаммы P-1 и P-2 были чувствительными, P-3 и P-4 устойчивыми к флуконазолу, P-5 устойчивым ко всем азолам, P-6 и P-7 устойчивыми ко всем азолам и эхинокандину, P-8 и P-9 обладали мультилекарственной устойчивостью (MDR). По данным MLST, клинические штаммы были генетически родственны. У P-4 было 4 изменения в *Erg11* (E266D, G307S, G450E и V488I), повышенная экспрессия *ERG11* и *CDR2*, а также изменение в *Tac1* (R688Q). P-5, P-7, P-8 и P-9 несли дополнительное изменение в *Erg11* (A61E), повышенную экспрессию *CDR1*, *CDR2* и *ERG11* (исключая P-7) и различающиеся аминокислотные изменения в *Tac1* (R673L). У эхинокандиноустойчивого штамма было изменение в *Fks1* S645P. Устойчивые к полиенам P-8 и P-9 были недостаточны по эргостерину и содержали мутационный сдвиг считывающей рамки в *ERG2* (F105SfsX23). Вирулентность была ослабленной (но эквивалентной) у клинических штаммов, но выше, чем у не родственного контролю штамма, устойчивого к азолу и эхинокандину. Итак, была показана разносторонняя способность *C. albicans* адаптироваться к воздействию антимикотиков. Роль новых мутаций в *TAC1*, *ERG11* и *ERG2* в индукции устойчивости нуждается в независимом подтверждении.

* Microbiology and Infection Control, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark.

Подготовлено Н. С. Бондаревой (Москва)

Указатель авторов и статей, опубликованных в журнале в 2015 году

- Абдулхаков С. Р. см. Бруслик Н. Л. и др. 3—4 (6)
 Абрамов А. В. см. Коломиец В. М. и др. 7—8 (18)
 Автономова А. В. см. Краснополянская Л. М. и др. 11—12 (29)
 Автономова А. В., Краснополянская Л. М., Шуктуева М. И., Исакова Е. Б., Бухман В. М. Оценка противоопухолевого действия погруженной культуры *Ophiocordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris* 7—8 (14)
 Агеевец В. А. см. Лисицына Е. С. и др. 9—10 (17)
 Акопов А. Л., Александрова Е. Б., Илькович М. М., Петров Д. В., Трофимов В. И. Ренгалин — новый эффективный и безопасный препарат в лечении кашля. Результаты многоцентрового сравнительного рандомизированного клинического исследования у больных с острыми респираторными инфекциями 1—2 (19)
 Александрова Е. Б. см. Акопов А. Л. и др. 1—2 (19)
 Алиева З. А. см. Кантемирова Б. И. и др. 9—10 (29)
 Анкирская А. С. см. Дмитренко О. А. и др. 7—8 (3)
 Ахатова Д. Р. см. Бруслик Н. Л. и др. 3—4 (6)
- Бабарина М. Б., Фадеева М. И., Савельева Л. В., Халаева А. Э. Клинический случай синдрома Иценко-Кушинга у пациентки с морбидным ожирением, перенёсшей бариатрическую операцию 5—6 (22)
 Баранова А. А. см. Садыкова В. С. и др. 11—12 (3)
 Беланов С. С. см. Калиногорская О. С. и др. 1—2 (10)
 Белов Б. С., Макаров С. А., Бялик Е. И. Инфекция протезированного сустава: современные подходы к диагностике и лечению 1—2 (47)
 Беседнова Н. Н., Кузнецова Т. А., Запорожец Т. С., Звягинцева Т. И. Морские бурые водоросли — источник новых фармацевтических субстанций антибактериальной направленности 3—4 (31)
 Беседнова Н. Н. см. Смолина Т. П. и др. 5—6 (3)
 Бибикова М. В., Даниленко А. Н., Катлинский А. В., Корыстова А. Ф., Кублик Л. Н., Левитман М. Х., Шапошникова В. В., Корыстов Ю. Н. Изменение ингибирующей множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток активности олигомицинов в комплексах с литием и цинком 11—12 (9)
 Биланенко Е. Н. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)
 Богуш Е. А. см. Богуш Т. А. и др. 3—4 (42)
 Богуш Т. А., Попова А. С., Дудко Е. А., Богуш Е. А., Тюляндина А. С., Тюляндин С. А., Давыдов М. И. ERCC1 как маркер резистентности рака яичников к препаратам платины 3—4 (42)
 Бондарева Т. А. см. Черникова Н. К. и др. 9—10 (46)
 Бондаренко Е. В. см. Вериковский В. А. и др. 11—12 (35)
 Борисевич С. В. см. Логинова С. Я. и др. 5—6 (8)
 Борисевич С. В. см. Логинова С. Я. и др. 7—8 (11)
 Борисевич С. В. см. Черникова Н. К. и др. 9—10 (46)
 Бруслик Н. Л., Ахатова Д. Р., Тойменцева А. А., Абдулхаков С. Р., Ильинская О. Н., Яруллина Д. Р. Оценка лекарственной устойчивости пробиотических лактобацилл 3—4 (6)
 Бунин В. Д. см. Гулий О. И. и др. 3—4 (14)
 Булгакова В. Г. см. Виноградова К. А. и др. 1—2 (39)
 Булгакова В. Г. см. Виноградова К. А. и др. 5—6 (27)
 Булгакова В. Г. см. Орлова Т. И. и др. 7—8 (47)
 Бухман В. М. см. Автономова А. В. и др. 7—8 (14)
 Бухман В. М. см. Краснополянская Л. М. и др. 11—12 (29)
 Бычкова Е. Н., Королев А. М., Олсуфьева Е. И., Мирчинк Е. П., Исакова Е. Б. Получение и изучение новых карбоксамидов антибиотиков эремомицина и ванкомицина с 4- или 3-аминометилфенилборной кислотой 9—10 (7)
 Бялик Е. И. см. Белов Б. С. и др. 1—2 (47)
- Валеев В. В., Коваленко А. Л., Таликова Е. В., Запуганов В. А., Дельви́г-Каменская Т. Ю. Биологические функции сукцината (обзор зарубежных экспериментальных исследований) 9—10 (33)
 Васильев Ю. Д. см. Румянцев С. А. и др. 1—2 (27)
 Васильева Б. Ф. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)
 Вдовин С. В. см. Селихова М. С. и др. 11—12 (39)
 Вериковский В. А., Минаков О. Е., И. Денисова О. И., Бондаренко Е. В. Результаты исследования чувствительности к ванкомицину метициллинорезистентных стафилококков в клинических отделениях крупного многопрофильного стационара и рекомендации по оптимизации антибактериальной терапии вызванной ими инфекции 11—12 (35)
 Виноградова К. А., Булгакова В. Г., Полин А. Н., Кожевин П. А. О биоплёнках стрептомицетов. I. Распространение и формирование 1—2 (39)
 Виноградова К. А., Булгакова В. Г., Полин А. Н., Кожевин П. А. О биоплёнках стрептомицетов. II. Применение в биотехнологии 5—6 (27)
 Власов А. П., Муратова Т. А., Рубцов О. Ю., Власов П. А., Потянова И. В., Турыгина С. А., Тингаев С. В. Ремасол в коррекции функциональных расстройств печени при остром билиарном панкреатите 5—6 (12)
 Власов П. А. см. Власов А. П. и др. 5—6 (12)
 Волкова М. О. см. Калиногорская О. С. и др. 1—2 (10)
 Ворошилова Т. М. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
- Галимзянов Х. М. см. Кантемирова Б. И. и др. 9—10 (29)
 Гладких Е. Г. см. Лапчинская О. А. и др. 9—10 (3)
 Голикова М. В., Струкова Е. Н., Портной Ю. А., Фирсов А. А. Прогнозирование развития антибиотикорезистентности бактерий методами фармакокинетики-фармакодинамического моделирования: альтернативные подходы к анализу экспериментальных данных 9—10 (12)
 Гомбоева Н. А. см. Румянцев С. А. и др. 1—2 (27)
 Гостев В. В., Калиногорская О. С., Попенко Л. Н., Черненко Т. В., Науменко З. С., Ворошилова Т. М., Захарова Ю. А., Хохлова О. Е., Круглов А. Н., Ершова М. Г., Молчанова И. В., Сидоренко С. В. Антибиотикорезистентность метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в Российской Федерации 1—2 (3)
 Гостев В. В. см. Калиногорская О. С. и др. 1—2 (10)
 Гостев В. В. см. Дмитренко О. А. и др. 7—8 (3)
 Гостев В. В., Калиногорская О. С., Круглов А. Н., Сидоренко С. В. Антибиотикорезистентность коагула-

зоотрицательных стафилококков, выделенных в стационарах Санкт-Петербурга и Москвы 9—10 (23)
Громовых Т. И. см. Садыкова В. С. и др. 11—12 (3)
Гулий О. И., Бунин В. Д., Ларионова О. С., Потемкина Е. Г., Игнатов О. В. Определения чувствительности микробных клеток к сульфаниламидным препаратам методом электрооптического анализа 3—4 (14)

Давыдов М. И. см. Богуш Т. А. и др. 3—4 (42)
Даниленко А. Н. см. Бибикова М. В. и др. 11—12 (9)
Дельви́г-Каменская Т. Ю. см. Валеев В. В. и др. 9—10 (33)
Денисова О. И. см. Вериковский В. А. и др. 11—12 (35)
Дворниченко В. В. см. Мориков Д. Д. и др. 7—8 (23)
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 7—8 (3)
Дорохина Т. В. см. Черникова Н. К. и др. 9—10 (46)
Дроздова О. М. см. Расулов М. М. и др. 3—4 (20)
Дудко Е. А. см. Богуш Т. А. и др. 3—4 (42)

Евдокимова А. Г., Рыжова Ю. В. Современные аспекты антигипертензивной терапии с позиции кардио- и нефропротективного воздействия: фокус на олмесартан 5—6 (34)
Еньчева Ю. А. см. Кузнецова М. В. и др. 11—12 (15)
Ершова М. Г. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
Ефименко Т. А. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)
Ефременкова О. В., Васильева Б. Ф., Зенкова В. А., Королев А. М., Лузиков Ю. Н., Ефименко Т. А., Маланничева И. А., Мирчинк Е. П., Исакова Е. Б., Биланенко Е. Н., Камзолкина О. В. Антимикробные свойства антибиотика эремоксиларина А, образуемого аскомицетным грибом из класса *Sordariomycetes* в условиях глубинного культивирования 11—12 (23)

Заплутанов В. А. см. Валеев В. В. и др. 9—10 (33)
Запорожец Т. С. см. Беседнова Н. Н. и др. 3—4 (31)
Запорожец Т. С. см. Смолина Т. П. и др. 5—6 (3)
Захарова Ю. А. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
Звягинцева Т. Н. см. Беседнова Н. Н. и др. 3—4 (31)
Зенкова В. А. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)

Игнатов О. В. см. Гулий О. И. и др. 3—4 (14)
Ильина Е. Н. см. Лисицына Е. С. и др. 9—10 (17)
Ильинская О. Н. см. Бруслик Н. Л. и др. 3—4 (6)
Илькович М. М. см. Акопов А. Л. и др. 1—2 (19)
Исакова Е. Б. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)
Исакова Е. Б. см. Автономова А. В. и др. 7—8 (14)
Исакова Е. Б. см. Бычкова Е. Н. и др. 9—10 (7)
Исакова Е. Б. см. Краснополянская Л. М. и др. 11—12 (29)

Кабаева Е. Н. см. Румянцева С. А. и др. 1—2 (27)
Калиногорская О. С. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)

Калиногорская О. С., Беланов С. С., Волкова М. О., Гостев В. В., Сидоренко С. В. Антибиотикорезистентность и серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей в Санкт-Петербурге в 2010—2013 гг. 1—2 (10)
Калиногорская О. С. см. Гостев В. В. и др. 9—10 (23)
Камзолкина О. В. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)
Кантемирова Б. И., Галимзянов Х. М., Степанова Н. А., Чернышева А. Х., Алиева З. А. Перспективы фармакогенетического тестирования для разработки алгоритмов персонализированного лечения туберкулёза органов дыхания в Астраханском регионе 9—10 (29)
Катлинский А. В. см. Бибикова М. В. и др. 11—12 (9)
Катруха Г. С. см. Лапчинская О. А. и др. 9—10 (3)
Ковалева Е. Л. см. Шаройкина М. В. и др. 1—2 (35)
Коваленко А. Л. см. Румянцева С. А. и др. 1—2 (27)
Коваленко А. Л. см. Валеев В. В. и др. 9—10 (33)
Ковалишена О. В. см. Дмитренко О. А. и др. 7—8 (3)
Кожевин П. А. см. Виноградова К. А. и др. 1—2 (39)
Кожевин П. А. см. Виноградова К. А. и др. 5—6 (27)
Козлов В. К. см. Стельмах В. В. и др. 3—4 (24)
Коломиец В. М., Абрамов А. В., Рачина Н. В., Рублева Н. В. Интенсификация этиотропной терапии больных запущенным туберкулёзом лёгких с использованием иммуномодуляторов 7—8 (18)
Королев А. М. см. Бычкова Е. Н. и др. 9—10 (7)
Королев А. М. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)
Корсакова Н. В. см. Расулов М. М. и др. 3—4 (20)
Коришун В. А. см. Садыкова В. С. и др. 11—12 (3)
Корыстов Ю. Н. см. Бибикова М. В. и др. 11—12 (9)
Корыстова А. Ф. см. Бибикова М. В. и др. 11—12 (9)
Краснополянская Л. М. см. Автономова А. В. и др. 7—8 (14)
Краснополянская Л. М., Ярина М. С., Автономова А. В., Усов А. И., Исакова Е. Б., Бухман В. М. Сравнительное изучение противоопухолевой активности полисахаридов из мицелия *Ganoderma lucidum* в опытах *in vivo* 11—12 (29)
Кублик Л. Н. см. Бибикова М. В. и др. 11—12 (9)
Кувари́на А. Е. см. Садыкова В. С. и др. 11—12 (3)
Кувишинова И. Н. см. Хрянин А. А. и др. 5—6 (16)
Кузнецова М. В., Еньчева Ю. А., Самарцев В. А. Влияние хлоргексидина и Пронтолана на смешанную и моновидовые биоплёнки, образованные *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* 11—12 (15)
Кузнецова Т. А. см. Беседнова Н. Н. и др. 3—4 (31)
Куляева В. В. см. Лапчинская О. А. и др. 9—10 (3)
Кураков А. В. см. Садыкова В. С. и др. 11—12 (3)
Круглов А. Н. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
Круглов А. Н. см. Гостев В. В. и др. 9—10 (23)

Лазарева И. В. см. Лисицына Е. С. и др. 9—10 (17)
Лапчинская О. А., Катруха Г. С., Терехова Л. П., Гладких Е. Г., Куляева В. В., Погосжева В. В., Орлова Г. И., Тренин А. С., Федорова Г. Б. Ирумамицин, образующий *Streptomyces roseoflavus* ИНА-1278 9—10 (3)
Ларионова О. С. см. Гулий О. И. и др. 3—4 (14)
Ларичев В. Ф. см. Смирнова И. П. и др. 3—4 (3)
Левитман М. Х. см. Бибикова М. В. и др. 11—12 (9)
Лисицына Е. С., Черненко Т. В., Ильина Е. Н., Лазарева И. В., Агеев В. А., Сидоренко С. В. Обнаружение генетических маркёров резистентности к β -лактам-

ным антибиотикам у грамотрицательных микроорганизмов с помощью ПЦР-диагностики 9—10 (17)
Литвяков Н. В. см. Цыганов М. М. и др. 9—10 (38)
Логинова С. Я., Борисевич С. В., Русинов В. Л., Уломский У. Н., Чарушин В. Н., Чупахин О. Н., Сорокин П. В. Изучение профилактической эффективности Триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита у белых мышей 5—6 (8)
Логинова 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 7—8 (11)
Лузиков Ю. Н. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)
Любасовская Л. А. см. Дмитренко О. А. и др. 7—8 (3)

Макаров С. А. см. Белов Б. С. и др. 1—2 (47)
Мазин П. В. см. Мазина Н. К. 11—12 (43)
Мазина Н. К., Мазин П. В. Метааналитический подход к оценке клинической эффективности инфузионного сукцинатсодержащего препарата Ремаксола при патологии печени разного генеза 11—12 (43)
Маланичева И. А. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)
Миллер С. В. см. Цыганов М. М. и др. 9—10 (38)
Минаков О. Е. см. Вериковский В. А. и др. 11—12 (35)
Мирчинк Е. П. см. Бычкова Е. Н. и др. 9—10 (7)
Мирчинк Е. П. см. Ефременкова О. В. и др. 11—12 (23)
Михайловская М. В. см. Селихова М. С. и др. 11—12 (39)
Молчанова И. В. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
Морилов Д. Д., Морилова Е. Г., Дворниченко В. В. Фармакоэкономический анализ использования гепатопротекторов в лечении лекарственного поражения печени после химиотерапии лимфомы Ходжкина 7—8 (23)
Морилова Е. Г. см. Морилов Д. Д. и др. 7—8 (23)
Моторина И. Г. см. Расулов М. М. и др. 3—4 (20)
Муратова Т. А. см. Власов А. П. и др. 5—6 (12)

Науменко З. С. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
Некрасова А. Н. см. Стельмах В. В. и др. 3—4 (24)
Неугодова Н. П. см. Шаройкина М. В. и др. 1—2 (35)

Олсуфьева Е. Н. см. Бычкова Е. Н. и др. 9—10 (7)
Орлова Г. И. см. Лапчинская О. А. и др. 9—10 (3)
Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Вторичные метаболиты морских микроорганизмов. I. Вторичные метаболиты морских актиномицетов 7—8 (47)

Петров Д. В. см. Акопов А. Л. и др. 1—2 (19)
Поджуйко В. Н. см. Черникова Н. К. и др. 9—10 (46)
Погожева В. В. см. Лапчинская О. А. и др. 9—10 (3)
Полин А. Н. см. Виноградова К. А. и др. 1—2 (39)
Полин А. Н. см. Виноградова К. А. и др. 5—6 (27)
Полин А. Н. см. Орлова Т. И. и др. 7—8 (47)
Попенко Л. Н. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
Попов Д. А. см. Дмитренко О. А. и др. 7—8 (3)
Попова А. С. см. Богуш Т. А. и др. 3—4 (42)
Портной Ю. А. см. Голикова М. В. и др. 9—10 (12)

Потемкина Е. Г. см. Гулий О. И. и др. 3—4 (14)
Потянова И. В. см. Власов А. П. и др. 5—6 (12)

Расулов М. М., Моторина И. Г., Юшков Г. Г., Дроздова О. М., Корсакова Н. В. Устойчивость к антибиотикам микроорганизмов, взятых из длительно незаживающих ран и облучённых светом различных длин волн 3—4 (20)

Рачина Н. В. см. Коломиец В. М. и др. 7—8 (18)
Решетников О. В. см. Хрянин А. А. и др. 5—6 (16)
Родионов Е. О. см. Цыганов М. М. и др. 9—10 (38)
Рогожин Е. А. см. Садыкова В. С. и др. 11—12 (3)
Рублева Н. В. см. Коломиец В. М. и др. 7—8 (18)
Рубцов О. Ю. см. Власов А. П. и др. 5—6 (12)
Румянцева С. А., Силина Е. В., Гомбоева Н. А., Ступин В. А., Васильев Ю. Д., Коваленко А. Л., Кабаева Е. Н. Клинико-патфизиологические корреляции при остром инсульте, визуализируемом по КТ в разные сроки 1—2 (27)
Русинов В. Л. см. Логинова С. Я. и др. 5—6 (8)
Русинов В. Л. С. В. см. Логинова С. Я. и др. 7—8 (11)
Рыжова Ю. В. см. Евдокимова А. Г. 5—6 (34)
Рябцева М. С. см. Шаройкина М. В. и др. 1—2 (35)

Савельева Л. В. см. Бабарина М. Б. и др. 5—6 (22)
Садыкова В. С., Кураков А. В., Коршун В. А., Рогожин Е. А., Громовых Т. И., Куваринова А. Е., Баранова А. А. Антимикробная активность штамма *Trichoderma citrinoviride* ВКПМ F-1228: оптимизация лабораторного культивирования и спектр действия индивидуальных пептаиболов 11—12 (3)
Самарцев В. А. см. Кузнецова М. В. и др. 11—12 (15)
Селихова М. С., Вдовин С. В., Михайловская М. В. Оптимизация антибиотикопрофилактики при малых гинекологических операциях 11—12 (39)
Сидоренко С. В. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
Сидоренко С. В. см. Калиногорская О. С. и др. 1—2 (10)
Сидоренко С. В. см. Дмитренко О. А. и др. 7—8 (3)
Сидоренко С. В. см. Лисицына Е. С. и др. 9—10 (17)
Сидоренко С. В. см. Гостев В. В. и др. 9—10 (23)
Силина Е. В. см. Румянцева С. А. и др. 1—2 (27)
Синёва О. Н., Терехова Л. П. Направленное выделение актиномицетов редких родов из почвы 7—8 (27)
Смирнова И. П., Ларичев В. Ф., Шнейдер Ю. А. Исследование активности L-лизин- α -оксидазы в опытах *in vitro* на моделях вирусов Синдбис, клещевого энцефалита, Западного Нила, Тягиня и Дхори 3—4 (3)
Смолина Т. П., Запорожец Т. С., Беседнова Н. Н. Изменение уровня экспрессии молекул адгезии клеток врождённого иммунитета человека гликополимерами морских бактерий 5—6 (3)
Сорокин П. В. см. Логинова С. Я. и др. 5—6 (8)
Сорокин П. В. см. Логинова С. Я. и др. 7—8 (11)
Стельмах В. В., Козлов В. К., Некрасова А. Н. Кинетика вирусной нагрузки HCV-RNA в сыворотке крови и периферических мононуклеарных клетках при применении безинтерфероновой схемы терапии (Циклоферон + Рибавирин) у пациента с циррозом печени в исходе хронического вирусного гепатита С 3—4 (24)

Степанова Н. А. см. Кантемирова Б. И. и др. 9—10 (29)
Струкова Е. Н. см. Голикова М. В. и др. 9—10 (12)
Ступин В. А. см. Румянцева С. А. и др. 1—2 (27)

Таликова Е. Н. см. Валеев В. В. и др. 9—10 (33)
Терехова Л. П. см. Синёва О. Н. 7—8 (27)
Терехова Л. П. см. Лапчинская О. А. и др. 9—10 (3)
Тингаев С. В. см. Власов А. П. и др. 5—6 (12)
Тойменцева А. А. см. Бруслик Н. Л. и др. 3—4 (6)
Тренин А. С. Методология поиска новых антибиотиков: состояние и перспективы 7—8 (34)
Тренин А. С. см. Лапчинская О. А. и др. 9—10 (3)
Трофимов В. И. см. Акопов А. Л. и др. 1—2 (19)
Турыгина С. А. см. Власов А. П. и др. 5—6 (12)
Тюляндин С. А. см. Богуш Т. А. и др. 3—4 (42)
Тюляндина А. С. см. Богуш Т. А. и др. 3—4 (42)

Уломский Е. Н. см. Логинова С. Я. и др. 7—8 (11)
Уломский У. Н. см. Логинова С. Я. и др. 5—6 (8)
Усов А. И. см. Краснопольская Л. М. и др. 11—12 (29)
Фадеева М. И. см. Бабарина М. Б. и др. 5—6 (22)
Федорова Г. Б. см. Лапчинская О. А. и др. 9—10 (3)
Фирсов А. А. см. Голикова М. В. и др. 9—10 (12)

Халлаева А. Э. см. Бабарина М. Б. и др. 5—6 (22)
Хмелев А. Л. см. Черникова Н. К. и др. 9—10 (46)
Хохлова О. Е. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
Хрянин А. А., Решетников О. В., Кувшинова И. Н. Токсоплазмоз: эпидемиология, диагностика и лечение 5—6 (16)

Чарушин В. Н. см. Логинова С. Я. и др. 5—6 (8)
Чарушин В. Н. см. Логинова С. Я. и др. 7—8 (11)
Черенькая Т. В. см. Гостев В. В. и др. 1—2 (3)
Черенькая Т. В. см. Лисицына Е. С. и др. 9—10 (17)
Черникова Н. К., Бондарева Т. А., Борисевич С. В., Подкуйко В. Н., Хмелев А. Л., Дорохина Т. В. Методы и средства купирования побочного действия вируса вакцины при оспопрививании 9—10 (46)
Чернышева А. Х. см. Кантемирова Б. И. и др. 9—10 (29)
Чупахин О. Н. см. Логинова С. Я. и др. 5—6 (8)
Чупахин О. Н. см. Логинова С. Я. и др. 7—8 (11)
Цыганов М. М., Родионов Е. О., Миллер С. В., Литвяков Н. В. Обоснование использования экспрессионных маркёров для персонализации химиотерапии рака лёгкого 9—10 (38)

Шапошникова В. В. см. Бибикова М. В. и др. 11—12 (9)
Шаройкина М. В., Рябцева М. С., Ковалева Е. Л., Неугодова Н. П. Влияние параметра «скорость введения» при выполнении теста «Аномальная токсичность» на обеспечение качества антибиотика группы цефалоспоринов — цефтриаксона 1—2 (35)
Шнейдер Ю. А. см. Смирнова И. П. и др. 3—4 (3)
Шуктуева М. И. см. Автономова А. В. и др. 7—8 (14)

Юшков Г. Г. см. Расулов М. М. и др. 3—4 (20)

Ярина М. С. см. Краснопольская Л. М. и др. 11—12 (29)
Ярулина Д. Р. см. Бруслик Н. Л. и др. 3—4 (6)

П Р А В И Л А Д Л Я А В Т О Р О В

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

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

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

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

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

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

6. Таблицы должны быть пронумерованы, **иметь название**, заголовки граф точно соответствовать их содержанию, а цифры в таблицах — цифрам в тексте. Необщепринятые сокращения в графах не допускаются. На каждую таблицу в тексте статьи должны быть **сноски**.

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

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

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

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

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

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

вителя и их международным непатентованным названием.

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

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

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

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

17. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

Зинфоро®

цефтаролина фосамил

Зинфоро® – новый бета-лактам с анти-MRSA активностью:

- **анти-MRSA активность при лечении осложненных инфекций кожи и мягких тканей¹**
- **активен в отношении проблемных штаммов *S. pneumoniae* при внебольничной пневмонии²**

Торговое название: Зинфоро® (Zinforo®)
Международное непатентованное название: цефтаролина фосамил

ПОКАЗАНИЯ

Препарат Зинфоро® показан для лечения у взрослых следующих инфекций:

- осложненные инфекции кожи и мягких тканей, вызванные чувствительными штаммами следующих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* (включая метициллин-резистентные штаммы), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* и *Morganella morganii*;
- внебольничная пневмония, вызванная чувствительными штаммами следующих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: *Streptococcus pneumoniae* (включая случаи, сопровождающиеся бактериемией), *Staphylococcus aureus* (только метициллин-чувствительные штаммы), *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

- Повышенная чувствительность к цефтаролину фосамилю или L-аргинину.
- Повышенная чувствительность к цефалоспорином.
- Тяжелые реакции повышенной чувствительности немедленного типа (например, анафилактическая реакция)
- на любое другое антибактериальное средство, имеющее бета-лактамную структуру (например, пенициллины или карбапенемы).
- Детский возраст до 18 лет.

С ОСТОРОЖНОСТЬЮ: судорожный синдром в анамнезе.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ

Применение у особых групп пациентов

Почечная недостаточность. Если клиренс креатинина (КК) ≤ 50 мл/мин, дозу препарата следует корректировать следующим образом:

Клиренс креатинина (мл/мин)*	Доза	Частота введения	Время инфузии
30 < КК ≤ 50	400 мг	каждые 12 часов	60 минут
15 $\leq$ КК ≤ 30	300 мг	каждые 12 часов	60 минут
терминальная стадия почечной недостаточности, включая пациентов, находящихся на гемодиализе**	200 мг	каждые 12 часов	60 минут

*Рассчитывается по формуле Кокрофта-Голта.

**Цефтаролин удаляется при гемодиализе. Препарат следует вводить по окончании процедуры гемодиализа в дни её проведения.

ПОБОЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ.

Очень часто: положительная прямая проба Кумбса. Часто: диарея, тошнота, рвота, боль в животе, запор, головная боль, головокружение, сыпь, зуд, повышение активности трансаминаз, флебит, брадикардия, гипергликемия, гипокалиемия, лихорадка, реакции в месте инфузии (эритема, флебит, боль). Нечасто: судороги, крапивница, ощущение сердцебиения, гепатит, гиперкалиемия, анемия, лейкопения, нейтропения, тромбоцитопения, колит, вызванный *Clostridium difficile*, гиперчувствительность / анафилаксия, отек губ и лица, нарушение функции почек (повышение концентрации креатинина крови). Редко: эозинофилия.

СРОК ГОДНОСТИ: 3 года.

Перед применением препарата ознакомьтесь, пожалуйста, с полным текстом инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата Зинфоро®.

Инструкция по медицинскому применению препарата Зинфоро® (Изменение 3 от 29.10.2015). РУ: ЛП-001912).

Литература:

1. Louis D. Saravolatz, Gary E. Stein, and Leonard B. Johnson. Ceftaroline: A Novel Cephalosporin with Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Infectious Diseases 2011; 52(9):1156-1163.
2. David J. Farrell, Mariana Castanheira, Rodrigo E. Mendes, Helio S. Sader, and Ronald N. Jones. In Vitro Activity of Ceftaroline Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*: A Review of Published Studies and the AWARE Surveillance Program (2008-2010). Clinical Infectious Diseases 2012; 55(S3):S206-14.

Дальнейшая информация предоставляется по требованию:

ООО «АстраЗенка Фармасьютикалз»: 125284 Москва, ул. Беговая д. 3, стр. 1. Тел. +7 (495) 799 56 99, факс: +7 (495) 799 56 98.
ZIN-942.234.011-24/12/2015

AstraZeneca

