

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 61



9-10'2016

Научно-практический журнал



Эргоферон

**Мощный противовирусный препарат
с противовоспалительным и антигистаминным
эффектами, с изученным механизмом действия
и высоким уровнем доказательности¹**

-  Быстрый клинический результат уже с первого дня терапии ОРВИ и гриппа²
-  Активен в отношении основных респираторных вирусов⁴
-  Снижает потребность в симптоматической терапии в 2 раза³
-  Разрешен к применению у детей с 6-ти месяцев⁴



Рег. № 007362/10



ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг»
Россия, 127473, Москва, 3-й Самотечный пер., д. 9
Тел./факс: (495) 276-15-71, www.materiamedica.ru

Реклама. Информация для специалистов

1. <https://clinicaltrials.gov>, <http://grls.rosminzdrav.ru>
2. Н.А. Геппе, Е.Г. Кондюрина, Антибиотики и химиотерапия, 2014, 59; 5—6
3. А.Л. Заплатников, Е.Г. Кондюрина, Детские инфекции 2015, №3
4. На основе инструкции по медицинскому применению препарата Эргоферон

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ

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 2016

Типография:

ООО «Литера»

Дата выхода: 30.12.2016

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 61

9—10'2016

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. б. н. Полин А. Н.

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

Ефременкова О. В., Габриэлян Н. И., Маланичева И. А.,
Ефименко Т. А., Терехова Л. П., Удалова В. В., Глухова А. А.,
Рогожин Е. А., Алферова В. А., Коршун В. А., Кубанова М. Х.,
Драбкина И. В., Крупенио Т. В.

Антибиотическая активность пробиотического штамма
Bacillus subtilis 534 в отношении клинических изолятов
Acinetobacter baumannii

Кулько В. Б., Кисиль О. В., Садыкова В. С.,
Михайлов В. Ф., Васильева И. М., Шуленина Л. В.,
Засухина Г. Д., Рогожин Е. А.

Исследование тионинов семян чёрного тмина
(*Nigella sativa*), обладающих цитотоксической,
регуляторной и антифунгальной активностью
Гостев В. В., Калиногорская О. С., Дмитренко О. А.,
Цветкова И. А., Сидоренко С. В.

Молекулярные механизмы снижения чувствительности
к цефтаролину метициллинорезистентных
Staphylococcus aureus

Еремин С. А., Хан О. Ю., Писарев В. В.,
Зверева Е. А., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б.

Флуоресцентный поляризационный иммуноанализ
для экспрессного контроля содержания антибиотиков:
разработка и характеристика на примере хлорамфеникола
Алиева К. Н., Струкова Е. Н., Голикова М. В.,
Портной Ю. А., Фирсов А. А.

Зависимая от концентрации антибиотика селекция
линезолидоустойчивых стафилококков в динамической
системе *in vitro*

В помощь практикующему врачу

Кондюрина Е. Г., Тюленева И. О., Бурцева Е. И.,
Трушаклова С. В., Мукашева Е. А., Виноградова А. А.,
Елкина Т. Н., Зеленская В. В.

Динамика клинической картины острого
обструктивного бронхита у детей
на фоне противовирусной терапии

Марченко Л. А., Чернуха Г. Е., Якушевская О. В.,
Гомболевская Н. А., Муравьева В. В.,
Припутневич Т. В., Анкирская А. С.

Клинические и микробиологические аспекты
хронического эндометрита
у женщин репродуктивного возраста

Обзоры

Орлова Т. И., Булгакова В. Г., Полин А. Н.

Вторичные метаболиты морских микроорганизмов.

II. Морские грибы и места их обитания

Беседнова Н. Н., Макаренко И. Д., Звягинцева Т. Н.,
Кузнецова Т. А., Запорожец Т. С.

Ингибирующее действие полисахаридов морских
гидробиев на формирование биопленок

Щипелева И. А., Марковская Е. И.

Антибактериальная терапия чумы.

Исторический срез и взгляд в будущее

По страницам журналов

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

Original Papers

3 Efremenkova O. V., Gabrielyan N. I., Malanicheva I. A.,
Efimenko T. A., Terekhova L. P., Udalova V. V.,
Glukhova A. A., Rogozhin E. A., Alferova V. A., Korshun V. A.,
Kubanov M. Kh., Drabkina I. V., Krupenyo T. V.

Antibiotic Activity of Probiotic Strain
Bacillus subtilis 534 Against Clinical Isolates
of *Acinetobacter baumannii*

8 Kul'ko V. B., Kisil O. V., Sadykova V. S.,
Mikhailov V. F., Vasilieva I. M., Shulenina L. V.,
Zasukhina G. D., Rogozhin E. A.

Investigation of Thionins from Black Cumin
(*Nigella sativa* L.) Seeds Showing Cytotoxic,
Regulatory and Antifungal Activity

17 Gostev V. V., Kalinogorskaya O. S., Dmitrenko O. A.,
Tsvetkova I. A., Sidorenko S. V.

Molecular Mechanisms of Ceftaroline Susceptibility
Reduction in Methicillin-Resistant
Staphylococcus aureus

22 Eremin S. A., Khan O. Yu., Pisarev V. V.,
Zvereva E. A., Zherdev A. V., Dzyantiev B. B.

Fluorescence Polarization Immunoassay
for Express Control of Antibiotic Levels: Design
and Characteristics for Chloramphenicol, as an Example

28 Alieva K. N., Strukova E. N., Golikova M. V.,
Portnoy Yu. A., Firsov A. A.

Concentration-Dependent Enrichment
of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus*
in an *in vitro* Dynamic Model

Guidelines for Practitioners

33 Kondyurina E. G., Tyuleneva I. O., Burtseva E. I.,
Trushakova S. V., Mukasheva E. A., Vinogradova A. A.,
Elkina T. N., Zelenskaya V. V.

Evaluating Changes in the Clinical Presentation
of Acute Obstructive Bronchitis in Preschool Children
Using Antiviral Therapy

44 Marchenko L. A., Chernukha G. E., Yakushevskaya O. V.,
Gombolevskaia N. A., Muravieva V. V.,
Priputnevich T. V., Ankirskaya A. S.

Clinical and Microbiological Aspects
of Chronic Endometritis in Women
of Reproductive Age

Reviews

52 Orlova T. I., Bulgakova V. G., Polin A. N.

Secondary Metabolites from Marine Microorganisms.
II. Marine Fungi and Their Habitats

64 Besednova N. N., Makarenko I. D., Zvyagintseva T. N.,
Kuznetsova T. A., Zaporozhets T. S.

Inhibitory Effect of Polysaccharides of Marine Hydrobionts
on Biofilm Formation

74 Shchipeleva I. A., Markovskaya E. I.

Plague Antibacterial Therapy.
Historical Aspects and Future Prospects

Abstracts

* Журнал входит в перечень ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

Антибиотическая активность пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534 в отношении клинических изолятов *Acinetobacter baumannii*

О. В. ЕФРЕМЕНКОВА^{1*}, Н. И. ГАБРИЭЛЯН², И. А. МАЛАНИЧЕВА¹, Т. А. ЕФИМЕНКО¹,
Л. П. ТЕРЕХОВА¹, В. В. УДАЛОВА¹, А. А. ГЛУХОВА¹, Е. А. РОГОЖИН¹, В. А. АЛФЕРОВА¹,
В. А. КОРШУН¹, М. Х. КУБАНОВА², И. В. ДРАБКИНА², Т. В. КРУПЕНИО²

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

² Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова Минздрава России, Москва

Antibiotic Activity of Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 534 Against Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*

O. V. EFREMENKOVA^{1*}, N. I. GABRIELIAN², I. A. MALANICHEVA¹, T. A. EFIMENKO¹,
L. P. TEREKHOVA¹, V. V. UDALOVA¹, A. A. GLUKHOVA¹, E. A. ROGOZHIN¹, V. A. ALFEROVA¹,
V. A. KORSHUN¹, M. KH. KUBANOVA², I. V. DRABKINA², T. V. KRUPENIO²

¹ Gause Research Institute of New Antibiotics, Moscow

² Academician V. I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

Пробиотический штамм *Bacillus subtilis* 534 — основа лекарственного препарата споробактерина, в условиях глубинного культивирования проявляет антибиотическое действие в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Спектр антимикробной активности культуральной жидкости зависит от сроков культивирования и интенсивности аэрирования. Установлено, что компонент №1 антибиотического комплекса эффективен в отношении клинических изолятов *Acinetobacter baumannii*: из 24 изолятов 20 чувствительны к компоненту №1, в том числе из 16 панрезистентных изолятов чувствительны 15.

Ключевые слова: пробиотик, *Bacillus subtilis*, антибиотик, антибиотикорезистентность, *Acinetobacter baumannii*.

Probiotic strain *Bacillus subtilis* 534 is the base of sporobacterin, a pharmaceutical. In submerged culture it showed antibiotic activity against many of gram-positive and gram-negative bacteria and fungi. The spectrum of the antimicrobial activity of the culture fluid depended on the cultivation time and aeration intensity. It was shown that component No. 1 of the antibiotic complex was effective against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: 20 out of 24 isolates were susceptible to component No. 1, including 15 strains out of 16 panresistant isolates.

Key words: probiotic, *Bacillus subtilis*, antibiotic, antibiotic resistance, *Acinetobacter baumannii*.

Acinetobacter baumannii — грамотрицательная условно патогенная бактерия, широко распространённая во внешней среде. За последние десятилетия резко возрастает число случаев инфицирования этой бактерией, которая становится всё более агрессивным патогеном, в том числе возбудителем нозокомиальных инфекций. Данный патоген поражает различные органы и особенно опасен для людей с ослабленным иммунитетом, например, для пациентов палат интенсивной терапии или пожилых людей в домах престарелых [1—6]. По мере распространения инфицирования *A. baumannii* растёт доля штаммов этого вида с устойчивостью к антибиотикам, в том числе с мно-

жественной лекарственной устойчивостью и панрезистентных, что повышает процент летальных исходов [7—9]. В настоящее время определены шесть особо опасных видов антибиотикорезистентных болезнетворных бактерий, объединённых в группу ESKAPE, одна из которых — *A. baumannii* [10, 11].

Для лечения пациентов, инфицированных резистентными штаммами *A. baumannii*, предлагаются схемы комбинированного применения антибиотиков и ужесточение мер санитарии [12—15]. Очевидно, что в сложившейся ситуации, наряду с контролем эпидемиологической обстановки, изучением механизмов резистентности и разработкой схем лечения, требуются новые эффективные антибиотики, а также антибиотики резерва.

Большое значение для профилактики и лечения инфекционных заболеваний имеет применение

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: * E-mail: ovefr@yandex.ru

ние пробиотиков. В частности, представляет интерес использование в медицинской практике транзитных пробиотиков, например, бацилл. Одним из лекарственных препаратов на основе бациллярных пробиотиков является споробактерин, эффективность которого показана в ряде публикаций [16—20]. Одним из факторов сложных взаимоотношений бациллярных пробиотиков с микрофлорой пациента является биосинтез антибиотиков. Ранее нами было показано, что пробиотический штамм *Bacillus subtilis* 534, представляющий основу лекарственного препарата споробактерина, в условиях глубинного культивирования *in vitro* образует не менее трёх антибиотиков с разным антимикробным спектром [21]. Поскольку вид *B. subtilis* является космополитом и встречается в разных природных экосистемах, ему свойственна широкая приспособляемость к разным условиям среды, что в частности выражается в большом разнообразии образуемых антибиотиков, отличающихся как по химической природе, так и по спектру антимикробного действия [22].

Целью настоящего исследования было изучение антимикробной активности пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534. В работе использовали коллекционные тест-штаммы разных видов, а также 24 клинических изолята патогенной бактерии *A. baumannii*, выделенные от пациентов реанимационных отделений.

Материал и методы

Объект исследования. Объектом исследования был штамм *Bacillus subtilis* 534 — основа лекарственного препарата споробактерина и образуемый им компонент №1 антибиотического комплекса. Штамм *B. subtilis* 534 был депонирован в Коллекции культур микроорганизмов Института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе под номером ИНА 01122.

Штаммы микроорганизмов. В качестве тест-микроорганизмов для определения антимикробной активности использовали 12 коллекционных тест-штаммов: грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* 537, *B. pumilus* NCTC 8241, *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Staphylococcus aureus* FDA 209P (MSSA), *S. aureus* INA 00761 (MRSA), грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Comamonas terrigena* VKPM B-7571, грибы *Aspergillus niger* INA 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259. Клинические изоляты *Acinetobacter baumannii* выделены в 2015—2016 гг. Идентификацию изолятов *A. baumannii* и определение их чувствительности к 15 антибиотикам проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе для идентификации микроорганизмов Siemens MicroScan Walk Away — 96 Plus System (США).

Условия культивирования. Для поверхностного культивирования штамма 534 и 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. Для глубинного культивирования использовали ту же среду без агара. Глубинное культивирование штамма 534 осуществляли в колбах Эрленмейера объёмом 750 мл с объёмом среды от 100 до 300 мл на ротаторной качалке (220 об/мин) при 28°C. Засев проводили суспензией спор в количестве 106 спор/мл. Грибные тест-

культуры *C. terrigena* VKPM B-7571 и *L. mesenteroides* VKPM B-4177 выращивали при температуре 28°C, все другие штаммы, включая пробиотический штамм *B. subtilis* 534, — при 37°C.

Определение антимикробной активности. Антимикробную активность определяли методом диффузии в агар. Для этого на поверхность агаровой среды с высевным газонем тест-штаммов или клинических изолятов *A. baumannii* помещали бумажные диски диаметром 6 мм с нанесённым исследуемым образцом. Культуральную жидкость штамма 534 в количестве 100 мкл закапывали в лунки диаметром 9 мм. Через сутки инкубирования определяли диаметры зон задержки роста микроорганизмов.

Выделение и предварительная очистка антибиотика. Через колонку, заполненную 80 мл сорбента Amberlite XAD-2, пропускали 0,8 л культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 534. Антибиотик десорбировали смесью *n*-бутанол-ацетон-вода (1:1:1) при нейтральном значении pH. Полученные элюаты упаривали в вакууме досуха при 37°C и сухой остаток растворяли в 60% водном этаноле. Дальнейшую очистку антибиотика проводили в колонке, заполненной силикагелем Kieselgel 60 (фирма Merck), используя ступенчатую элюцию растворителями хлороформ-метанол (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 и 5:5). Для выделения компонента №1 фракции с колонки проверяли на биологическую активность в отношении тест-штамма *S. cerevisiae*. Активную фракцию упаривали досуха, растворяли в метаноле и анализировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах с силикагелем в системе растворителей этилацетат-метанол (1:4) с последующей биоавтографией на газоне тест-штамма. Спектр УФ-поглощения определяли на спектрофотометре UV-1601 PC (Shimadzu, Япония).

Результаты и обсуждение

Ранее нами было установлено, что при глубинном культивировании штамма 534 в разные сроки наблюдается проявление антибиотической активности в отношении разных тест-штаммов [21]. Из этого был сделан вывод о способности штамма 534 образовывать не менее трёх антибиотиков с разным антимикробным спектром. Продолжая эти исследования, мы варьировали условия аэрирования за счет изменения объёма среды в колбах. Было показано, что увеличение объёма среды в колбах со 100 мл до 200 мл приводит к уменьшению противогрибковой активности, а в колбах с 300 мл среды противогрибковая активность отсутствует. В отношении грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* 537, *B. pumilus* NCTC 8241, *L. mesenteroides* VKPM B-4177, *M. luteus* NCTC 8340 наблюдали другую тенденцию — в колбах со 100 мл среды активности нет, но она проявляется на высоком уровне при ухудшении аэрирования. На активность в отношении двух штаммов золотистого стафилококка (*S. aureus* FDA 209P и *S. aureus* INA 00761) условия аэрирования существенного влияния не оказывали. Активность в культуральной жидкости в отношении грамотрицательных тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *C. terrigena* VKPM B-7571 на этом этапе обнаружена не была. В табл. 1 приведена антибиотическая активность, которую способен проявлять штамм 534 в условиях глубинного культивирования при варьировании сроков и условий аэрирования.

Таблица 1. Антимикробный спектр и наивысший установленный уровень антибиотической активности культуральной жидкости (К.Ж.) штамма *B.subtilis* 534 и выделенного из нее сырца компонента №1

Тест-штаммы	Зона задержки роста (мм)	
	К.Ж.	Компонент № 1
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	18—20	7—9
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	27—30	8—10
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	10—12	Следы
<i>Bacillus mycoides</i> 537	16—18	10
<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	22—24	10
<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	23—25	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177	16—18	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	10—15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0
<i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259	13—14	13—14
<i>Aspergillus niger</i> INA 00760	13—14	13—14

Таблица 2. Эффективность сырца компонента №1 антибиотического комплекса пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534 в отношении клинических изолятов *Acinetobacter baumannii*

№№ клинических изолятов	Зоны подавления роста под действием компонента №1, мм	Отношение клинических изолятов к 15 антибиотикам		
		R	I	S
1630	9	15	0	0
1839	9	14	1(SAM)	0
2050	9	15	0	0
2455	8	15	0	0
2617	12	15	0	0
3037	10	14	1(GM)	0
3050	0	13	2(GM, PIP)	0
3122	7	15	0	0
3164	0	13	2(GM, LVX)	0
3166	7	15	0	0
3208	8	15	0	0
3238	7	12	3 (GM, CEP, SAM)	0
3255	Следы	15	0	0
3275	Следы	3	5 (PIP, GM, CRO)	7 (AN, CEP, SAM, CIP, LVX, MEM, NN)
3613	Следы	15	0	0
4006	Следы	15	0	0
4066	Следы	15	0	0
4074	Следы	15	0	0
4165	9	12	1(MEM)	1(Te)
4200	Следы	15	0	0
4315	Следы	15	0	0
4354	8	15	0	0
4372	0	15	0	0
4374	0	13	1(MEM)	1(Te)

Примечание. Резистентность определяли к 15 антибиотикам: амикацин (AN), ампициллин/сульбактам (SAM), гентамицин (GM), имипенем (IPM), левофлоксацин (LVX), меропенем (MEM), пиперациллин (PIP), тетрациклин (Te), тобрамицин (NN), триметоприм/сульфаметоксазол (SXT), цефепим (FEP), цефотаксим (CTX), цефтазидим (CAZ), цефтриаксон (CRO), ципрофлоксацин (CIP). R — устойчивость, I — промежуточная чувствительность, S — чувствительность. «Следы» — толщина кольца зоны задержки роста вокруг диска с испытуемым на антибиотическую активность образцом не превышает 1 мм.

Из трёх ранее описанных компонентов был наработан сырец компонента №1 антибиотического комплекса [21]. Для этого использовали культуральную жидкость штамма 534 в возрасте двух суток, когда проявляется наивысшая активность в отношении грибных тестов. Биологическим тестом при выделении и очистке антибиотика был штамм пекарных дрожжей *S.cerevisiae* RIA 259. Зона, обладающая антибиотической активностью в отношении *S.cerevisiae* RIA 259, на TCX

имеет $R_f=0,5$ на пластинах с силикагелем в системе растворителей этилацетат—метанол (1:4). Антибиотик, элюированный из активной зоны, поглощает свет при длине волны 222, 267, 275 и 287 нм, что позволяет отнести его к антибиотикам полиенам, а именно к триенам. В системе хлороформ—метанол (9:1) антибиотик имеет $R_f=0,76$. В итоге из 0,8 л культуральной жидкости было получено 52 мг сырца компонента №1 антибиотического комплекса штамма 534. Для определения

антибиотического спектра сырца компонента №1 мы использовали 12 коллекционных тест-штаммов. На диски наносили по 100 мкг сырца в 5 мкл 50% водного этанола. Наряду с активностью в отношении бацилл, золотистого стафилококка и грибов, была установлена антибиотическая активность по отношению к тест-штамму *E.coli* ATCC 25922. Это является результатом концентрирования антибиотика в ходе выделения и очистки, что позволило проявиться активности в отношении *E.coli* ATCC 25922 — одного из трёх использовавшихся тест-штаммов грамотрицательных бактерий (см. табл. 1). После этого было принято решение исследовать антибиотическое действие сырца компонента №1 в отношении клинических изолятов *A.baumannii*. Было исследовано 24 изолята, полученных от разных больных и отличающихся по спектру устойчивости к 15 антибиотикам медицинского назначения: 2 изолята чувствительны только к тетрациклину (Те) и обладают промежуточной чувствительностью к меропенему (МЕМ), 1 изолят чувствителен к 7 антибиотикам и обладает промежуточной чувствительностью к 3 антибиотикам (PIR, GM, CRO); 16 изолятов панрезистентны, т.е. устойчивы ко всем 15 антибиотикам. Из 16 панрезистентных изолятов *A.baumannii* 9 чувствительны к ком-

поненту №1 пробиотического штамма 534, 6 проявляют слабую чувствительность («следы») и только один изолят (№4372) устойчив к компоненту №1 (табл. 2). В общей сложности из 24 изолятов 20 чувствительны к компоненту №1.

Заключение

Эффективность лекарственного препарата споробактерина предположительно связана со способностью пробиотического штамма *B.subtilis* 534 образовывать антибиотики. На примере тест-штаммов, а также клинических изолятов *A.baumannii* с множественной лекарственной устойчивостью показано, что антибиотические соединения штамма 534 способны преодолевать лекарственную устойчивость микроорганизмов. Сам транзитный препарат споробактерин не обладает антибиотическим действием [21], однако нельзя исключать, что за время прохождения через кишечник, составляющее 8–10 сут, штамм 534 образует антимикробные соединения. Целесообразно дальнейшее химическое изучение, доклиническое и, в случае его успешности, клиническое испытание образуемых антибиотических соединений с точки зрения их применения в качестве медицинских препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sengstock D.M., Thyagarajan R., Apalara J., Mira A., Chopra T., Kaye K.S. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging pathogen among older adults in community hospitals and nursing homes. Clin Infect Dis 2010; 50: 12: 1611–1616.
2. Howard A., O'Donoghue M., Feeney A., Sleanor R.D. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. Virulence 2012; 3: 3: 243–250.
3. Чеботарь И.В., Лазарева А.В., Масалов Я.К., Михайлович В.М., Маянский Н.А. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства. Вестник РАМН 2014; 40: 9–10: 39–50. / Chebotar' I.V., Lazareva A.V., Masalov Ja.K., Mihajlovich V.M., Majanskiy N.A. *Acinetobacter*: mikrobiologicheskie, patogeneticheskie i rezistentnye svoystva. Vestnik RAMN 2014; 40: 9–10: 39–50. [in Russian]
4. Ghasemian R., Ahanjani M., Ebrahim Fatehi E., Shokri M. Prevalence and antibiotic resistance pattern of *Acinetobacter* isolated from patients admitted in ICUs in Mazandaran, Northern Iran. Global J Health Science 2016; 8: 11: 112–119.
5. Gong Y., Shen X., Huang G., Zhang C., Xiaoqiang Luo X., Supeng Yin S., Jing Wang J., Fuquan Hu F., Yizhi Peng Y., Li M., Gong Y. Epidemiology and resistance features of *Acinetobacter baumannii* isolates from the ward environment and patients in the burn ICU of a Chinese hospital. J Microbiology 2016; 54: 8: 551–558.
6. Gonzalez-Villoria A.M., Valverde-Garduno V. Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* increasing success remains a challenge as a nosocomial pathogen. Hindawi Publishing Corporation J Pathogens 2016; 1–10.
7. Durante-Mangoni E., Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. Future Microbiol 2011; 4: 407–422.
8. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. Клин микробиол антимикроб химиотер 2014; 16: 4: 266–272. / Suhorukova M.V., Ejdel'shtejn M.V., Skleenova E.Ju., Ivanchik N.V., Timohova A.V., Shek E.A., Dehnych A.V., Kozlov R.S. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nyh shthammov *Acinetobacter* spp. v stacionarah Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo jepidemiologicheskogo issledovanija MARAFON v 2011–2012 gg. Klin mikrobiol antimikrob himioter 2014; 16: 4: 266–272. [IN Russian]
9. Potron A., Poirel L., Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Int J Antimicrobial Agents 2015; 45: 6: 568–585.
10. Rice L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no escape. J Infect Dis 2008; 197: 8: 1079–1081.
11. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. Antibiotics 2013; 66: 10: 571–591.
12. Тапальский Д.В., Мозгова А.В., Козлова А.И. Эффективность комбинации антибиотиков в отношении карбапенем-резистентных госпитальных изолятов *Acinetobacter baumannii*. Клин инфектол паразитол 2014; 3: 95–103. / Tapal'skij D.V., Mozgova A.V., Kozlova A.I. Jeffektivnost' kombinacii antibiotikov v otnoshenii karbapenem-rezistentnyh gospital'nyh izolatov *Acinetobacter baumannii*. Klin infektol parazitolog 2014; 3: 95–103. [in Russian]
13. Tuon F.F., Rocha J.L., Merlini A.B. Combined therapy for multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection — is there evidence outside the laboratory? J Med Microbiol 2015; 64: 9: 951–959.
14. Leite G.C., Oliveira M.S., Perdigão-Neto L.V., Rocha C.K.D., Guimarães T., Rizek C., Levin A.S., Costa S.F. Antimicrobial combinations against pan-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates with different resistance mechanisms. // PlosOne // 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151270>
15. Liepins M., Simanis R., Lejnicks A. Decreasing prevalence of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in Riga East University hospital. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B 2016; 70: 4: 232–236.
16. Никитенко В.И., Полякова В.С., Никитенко М.В. Препарат споробактерин. Новые данные о механизме действия этого и других живых бактериальных препаратов. Науч вест Тюменской мед акад 2001; 2: 70–72. / Nikitenko V.I., Poljakova V.C., Nikitenko M.V. Preparat sporobakterin. Novye dannye o mehanizme dejstva jetogo i drugih zhivyh bakterial'nyh preparatov. Nauch vest Tjumenskoj med akad 2001; 2: 70–72. [in Russian]
17. Третьяков А.А., Стадников А.А., Вальшев А.В. Клинико-экспериментальное обоснование применения споробактерина в комплексной терапии при механической желтухе. Анали травматол ортопед 2001; 2: 42–48. / Tret'jakov A.A., Stadnikov A.A., Valyshev A.V. Kliniko-jeksperimental'noe obosnovanie primenenija sporobakterina v kompleksnoj terapii pri mehanicheskoj zheltuhe. Annal travmatol ortoped 2001; 2: 42–48. [in Russian]
18. Габриэлян Н.И., Давыдов Д.С., Горская Е.М. Использование споробактерина в послеоперационном периоде у пациентов кардиохирург-

- гического профиля. Антагонизм *in vitro* споробактерина в отношении нозокомиальных штаммов бактерий. Вестн трансплантол искусств органов 2008; 6: 12—18. / *Gabrijeljan N.I., Davydov D.S., Gorskaja E.M.* Ispol'zovanie sporobakterina v posleoperacionnom periode u pacientov kardiohirurgicheskogo profilja. Antagonizm *in vitro* sporobakterina v otnoshenii nozokomial'nyh shtammov bakterij. Vestn transplantol iskusstv organov 2008; 6: 12—18. [in Russian]
19. *Сорокина В.О., Минасов Б.Ш., Попова О.В., Попов О.С.* Применение споробактерина в лечении пациентов с ожоговыми ранами. Мед вестн Башкортостана 2013; 8: 6: 106—108. / *Sorokina V.O., Minasov B.Sh., Popova O.V., Popov O.S.* Primenenie sporobakterina v lechenii pacientov s ozhogovymi ranami. Med vestrn Bashkortostana 2013; 8: 6: 106—108. [in Russian]
 20. *Казаков Э.Н., Габриэлян Н.И., Сенченко О.Р., Петраков К.В., Арефьева Л.И., Воронин Е.М.* К вопросу о профилактике инфекционных осложнений после кардиохирургических вмешательств в условиях искусственного кровообращения. Росс мед журн 2013; 2: 13—16. / *Kazakov Je.N., Gabrijeljan N.I., Senchenko O.R., Petrakov K.V., Arefeva L.I., Voronin E.M.* K voprosu o profilaktike infekcionnyh oslozhnenij posle kardiohirurgicheskikh vmeshatel'stv v uslovijah iskusstvennogo krovoobrashhenija. Ross med zhurn 2013; 2: 13—16. [in Russian]
 21. *Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Крупенио Т.В., Зенкова В.А., Ефименко Т.А., Маланicheva И.А., Сумарукова И.Г., Ефременкова О.В., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С.* К вопросу оценки антимикробной активности бациллярного пробиотика *Bacillus subtilis* (штамм 534). Эпидемиол инфек бол Актуальные вопросы 2016; 1: 41—47. / *Gabrijeljan N.I., Gorskaja E.M., Krupenio T.V., Zenkova V.A., Efimenko T.A., Malanicheva I.A., Sumarukova I.G., Efremenkova O.V., Evlashkina V.F., Davydov D.S.* K voprosu ocenki antimikrobnnoj aktivnosti baciiljarnogo probiotika *Bacillus subtilis* (shtamm 534). Jepidemiol infek bol Aktual'nye voprosy 2016; 1: 41—47. [in Russian]
 22. *Маланicheva И.А., Козлов Д.Г., Ефименко Т.А., Зенкова В.А., Катруха Г.С., Резникова М.И., Королёв А.М., Борщевская Л.Н., Тарасова О.Д., Синецкий С.П., Ефременкова О.В.* Новые антибиотики, образуемые штаммами *Bacillus subtilis*. Микробиология 2014; 83: 4: 445—450. / *Malanicheva I.A., Kozlov D.G., Efimenko T.A., Zenkova V.A., Katruha G.S., Reznikova M.I., Koroljov A.M., Borshhevskaja L.N., Tarasova O.D., Sineckij S.P., Efremenkova O.V.* Novye antibiotiki, obrazuemye shtammami *Bacillus subtilis*. Mikrobiologija 2014; 83: 4: 445—450. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ефременкова О.В. — руководитель сектора, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Маланичева И.А. — 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

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

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

Коршун В.А. — руководитель лаборатории, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва

Габриэлян Н.И. — заведующая отделом, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И.Шумакова» Минздрава России, Москва

Кубанова М.Х. — врач-бактериолог, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И.Шумакова» Минздрава России, Москва

Драбкина И.В. — врач-бактериолог, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И.Шумакова» Минздрава России, Москва

Крупенио Т.В. — лаборант исследователь, ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И.Шумакова» Минздрава России, Москва

Исследование тионинов семян чёрного тмина (*Nigella sativa*), обладающих цитотоксической, регуляторной и антифунгальной активностью

А. Б. КУЛЬКО¹, О. В. КИСИЛЬ², В. С. САДЫКОВА², В. Ф. МИХАЙЛОВ³, И. М. ВАСИЛЬЕВА⁴,
Л. В. ШУЛЕНИНА³, Г. Д. ЗАСУХИНА⁴, Е. А. РОГОЖИН^{2,5}

¹ Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения, Москва

² НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

³ Государственный научный центр Российской Федерации Институт биофизики ФМБА, Москва

⁴ Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва

⁵ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Investigation of Thionins from Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seeds Showing Cytotoxic, Regulatory and Antifungal Activity

A. B. KUL'KO¹, O. V. KISIL², V. S. SADYKOVA², V. F. MIKHAILOV³, I. M. VASILIEVA⁴,
L. V. SHULENINA³, G. D. ZASUKHINA⁴, E. A. ROGOZHIN^{2,5}

¹ Municipal Scientific and Practical Center for Tuberculosis Control, Moscow

² Gause Research Institute of New Antibiotics, Moscow

³ Federal Medical Biophysical Center, Moscow

⁴ N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

⁵ M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Тионины (NsW1 и NsW2), ранее выделенные из семян эндемичного среднеазиатского растения — чёрного тмина, или чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), и обладающие выраженным ингибирующим действием по отношению к ряду бактериальных и дрожжевых патогенов, были исследованы на цитотоксические свойства против линий опухолевых клеток (AsPC-1, Colo357, RD и Jukart) в тестах *in vitro* в нано- и микромолярном диапазоне действующих концентраций, а также в качестве модуляторов экспрессии генов, контролирующих превращение нормальных клеток в злокачественные. Было обнаружено подавление экспрессии генов семейства *MMP*, *RhoA*, *miR21* в клетках рабдомиосаркомы человека (RD), тогда как влияние молекул на эти гены в клетках крови не было обнаружено. Показано, что тионины чёрного тмина в клетках RD и Jukart индуцируют почти 90% гибели клеток. Кроме того, показано ингибирующее действие данных полипептидов на клинические изоляты грибов *Aspergillus ochraceus* и *A.fumigatus* на уровне, сопоставимом с активностью препарата амфотерицина В. Эти данные указывают на то, что исследованные полипептиды можно рассматривать как перспективные противоопухолевые и антимикотические природные агенты.

Ключевые слова: тионины, чёрный тмин, *Nigella sativa*, цитотоксичность, противоопухолевая активность, экспрессия генов, антимикотики, *Aspergillus spp.*

Thionins (NsW1 and NsW2), earlier isolated from the seeds of endemic Middle-Asian black cumin (*Nigella sativa* L.), showing significant inhibitory action on some bacterial and yeast pathogens were investigated for cytotoxic properties against several tumor cell lines (AsPC-1, Colo357, RD and Jukart) *in vitro* within nano- and micromolar ranges of the active concentrations and as modulators of expression of the genes controlling conversion of normal cells to malignant ones. Suppression of the expression of the genes from *MMP*, *RhoA*, *miR21* families in human rhabdomyosarcoma (RD) cells was observed, whereas the influence of the molecules on the genes in normal blood cells was not identified. It was shown that the thionins from black cumin induced almost 90% of the cell death in RD and Jukart lines. Moreover, the polypeptides inhibited clinical isolates of *Aspergillus ochraceus* and *A.fumigatus* at the level comparable with that of amphotericin B. The data demonstrated that the peptides could be considered as perspective antitumor and antimycotic agents.

Key words: thionins, black cumin, *Nigella sativa*, cytotoxicity, antitumor activity, gene expression, antimycotics, *Aspergillus spp.*

Введение

Растительные тионины представляют собой семейство цистеин-богатых пептидов с молеку-

лярной массой около 5 кДа, обнаруженных у различных одно- и двудольных растений. В настоящее время известно более 100 последовательностей тионинов, выделенных из 15 видов растений [1]. По числу остатков цистеина в молекуле тионины делятся на две группы: пептиды, содержащие 6 и 8 остатков цистеина, соответственно [2]. Показано, что тионины локализованы в клеточ-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 119021 Москва, ул. Большая Пи-роговская, дом 11, стр.1. НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе

ных вакуолях [3]. Тионины синтезируются в виде препробелков с молекулярной массой около 18 кД, которые включают в себя сигнальный пептид и С-концевой пропептид [4]. Известно, что тионины ингибируют рост бактерий и грибов *in vitro* [5], также синтез данных молекул резко увеличивается в ответ на проникновение в растение патогенных микроорганизмов [6–8]. Кроме того, они действуют на культуры клеток млекопитающих и насекомых, и растительные протопласты [1, 9, 10]. Ранее были изучены свойства экстрактов 13 африканских растений [11], женьшеня, лимонника [12], солодки [13] и др. Антимутагенной и антиканцерогенной активностью обладал также экстракт чеснока (*Allium sativum*), который эффективно снижал повреждающее действие мутагенов на клетки человека, стимулируя процессы репарации [14]. Кроме того, растительные экстракты в ряде случаев повышают эффективность традиционных противоопухолевых средств, ограничивая степень их побочного эффекта.

К таким перспективным противоопухолевым растительным экстрактам может быть отнесена чернушка посевная (*Nigella sativa*), обладающая способностью ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз в различных спонтанных или индуцированных канцерогенами опухолевых клетках животных [15]. При этом авторами были получены результаты, свидетельствующие о снижении экспрессии онкогенов (*cMyc*, *Brca1*, *Brca2* и др.) и повышении экспрессии генов-супрессоров (*p53* и *p21*), что может свидетельствовать о содержании в экстракте растения действующего вещества или их комплекса, обладающее свойствами, влияющих на экспрессию генов, контролирующих те или иные процессы в клетке. Ранее из семян чёрного тмина был выделен и охарактеризован комплекс полипептидов, обладающих антимикробными (в том числе антифунгальными) свойствами в биотестах *in vitro* по отношению к ряду фитопатогенных микроорганизмов [16, 17], а также условно-патогенным бактериям и дрожжеподобным грибам [18].

Цель настоящей работы заключалась в изучении цитотоксических, регуляторных и антифунгальных свойств антимикробных пептидов, принадлежащих к семейству тионинов, в том числе явления модификации экспрессии генов, контролирующих процессы онкогенеза, в клетках человека.

Материал и методы

Биологический материал. Семена. В работе были использованы семена чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), собранные на территории Республики Узбекистан в 2008 г. Семена хранились в тёмном сухом проветриваемом помещении при температуре 15°C.

Микроорганизмы. Протестированные на чувствительность к тионинам клинические штаммы грибов р.

Aspergillus были выделены при диагностике пневмомикозов у больных туберкулёзом, в микологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом ДЗМ»: *A.flavus* 905м (содержимое лёгочной полости), *A.fumigatus* 163м (содержимое лёгочной полости), *A.niger* (мокрота), *A.ochraceus* 497м (жидкость БАЛ) и *A.terreus* 1133м (мокрота). Все эти штаммы проявляли устойчивость *in vitro* к препарату флуконазол (с помощью системы «Sensititre», TREK Diagnostics Systems были установлены максимально высокие значения МПК флуконазола: >256 мкг/мл), что подтверждает наличие природной устойчивости у грибов рода *Aspergillus* к флуконазолу [19–22].

Линии опухолевых клеток AsPC-1 (рак поджелудочной железы), Colo357 (панкреатическая карцинома) (лаборатория клеточных взаимодействий ИБХ РАН); RD (рабдомиосаркома человека) и Jukart (Т-клеточная форма острого лимфобластного лейкоза) (лаборатория молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов ФМБЦ ФМБА).

Выделение тионинов из семян чёрного тмина проводили в строгом соответствии методике, описанной в работе [18]. Выделение тионина из зерновок пшеницы (*Triticum kiharae*) осуществляли, как описано в [23].

Определение концентрации тионинов проводили спектрофотометрическим методом. Для этого высушенный пептид растворяли в 1 мл деионизированной воды. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре U-3210 («Hitachi», Япония). В качестве контроля использовали деионизированную воду. Концентрацию белков и пептидов определяли по спектру с использованием следующей формулы: $C = 1,55A_{280} - 0,76A_{260}$, где A_{280} — оптическая плотность раствора при 280 нм, A_{260} — оптическая плотность раствора при 260 нм.

Методы определения функциональной активности. **Культивирование опухолевых клеток** AsPC-1, Colo357, RD и Jukart. Клетки культивировали в пластиковой посуде в среде DMEM (модифицированная среда Дульбекко) с добавлением 3% телячьей эмбриональной сыворотки. Монослой достигался на 3 сутки. Конечная концентрация клеток составляла примерно 1 млн/мл.

Культивирование клеток крови. Кровь брали из вены и помещали в гепаринизированные пробирки. Перед посадкой кровь суспендировали, добавляли готовую среду RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), содержащую 10% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота, глютамин (30 мг/100 мл среды), пенициллин (1000 ед./100 мл среды), ФГА (1 мл разведённого в 5 мл флакона/100 мл среды). Полученный раствор разливали по 3 мл в стерильные флаконы и инкубировали при 37°C в течение суток. Инкубирование линий опухолевых клеток с веществами. Тестируемые соединения вносили через 20–24 ч после посадки клеток. Инкубацию клеток проводили в течение 20–24 ч до обработки.

Определение уровня экспрессии генов. Уровень экспрессии генов оценивали по содержанию в клетках их мРНК. Тотальную РНК выделяли тризольным методом с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Для синтеза кДНК использовали набор реактивов для обратной транскрипции «GenePak PCR Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия), содержащий обратную транскриптазу М-MLV («ThermoScientific», США) и случайные гексануклеотидные праймеры, согласно протоколу фирмы-производителя. Тотальную РНК использовали в реакции обратной транскрипции с добавлением специфического «stem-loop»-праймера к зрелой miR34a (ООО «ДНК-Синтез», Россия) и mir21 (НПФ «Литех», Россия) в отдельных пробирках. В смесь, содержащую 1×ОТ буфер (P/N: 4319981, «Applied Biosystems», США), 0,25 mM dNTPs, 3,33 ед/мкл обратной транскриптазы М-MLV («ThermoScientific», США) и 0,25 ед/мкл ингибитора РНК-азы («Applied Biosystems», США), вносили 3 мкл (50 нМ) «stem-loop» праймера и 5 мкл суммарной РНК. «Stem-loop»-праймеры (*miR34a*: 5' GTCC-

TATCCAGTGTCTGGGTCCGAGTGATTTCGCACTGGATAC-GACACAACCA-3/ и miR21: 5/- CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG TCA ACA TC-3/) были использованы для синтеза первой цепи кДНК при следующих температурных условиях: 16°C/ 30 мин, 42°C/30 мин и 85°C/5 мин. В контрольные пробы для обратной транскрипции вместо РНК была добавлена вода.

Количественное определение экспрессии генов проводили методом двухстадийной ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan, или в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I. Амплификацию исследуемых генов проводили на приборе «Cycler iQ5 Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad Laboratories», США) в объеме 25 мкл, содержащем готовую реакцию смесь для ПЦР («ThermoScientific», США), кДНК, а также специфические праймеры (НПФ «Литех», Россия) и зонды (ООО «ДНК-Синтез», Россия). Последовательности и концентрация праймеров и зондов, а также условия проведения ПЦР представлены в табл. 1.

Данные анализировали с использованием метода порогового значения цикла сравнения (C_t) с нормализацией по экспрессии гена b-actin в каждом образце. Для проверки специфичности ПЦР генов при использовании интеркалирующего красителя SYBR Green I продукты амплификации анализиро-

вали по кривым плавления («melt curve analysis») в следующих условиях: в диапазоне от 55°C/5 мин до 95°C/1 мин с шагом 1°C/15 с. При обработке результатов ПЦР в реальном времени вычисляли значение $2^{-\Delta\Delta C_t}$, которое показывает, во сколько раз изменяется экспрессия исследуемого гена по сравнению с контролем. $\Delta\Delta C_t$ рассчитывали как: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{опыт}) - \Delta C_t(\text{контроль})$, и каждое значение $\Delta C_t = C_t(\text{исследуемый ген}) - C_t(\text{b-actin})$, где C_t — число циклов, необходимое для достижения порогового уровня флуоресценции, превышающего 10 стандартных отклонений от уровня фоновой флуоресценции цикла ПЦР.

Определение антибиотической активности. Антибиотическое действие в отношении клинических изолятов микромицетов р. *Aspergillus* оценивали с помощью стерильных бумажных дисков (Бумага фильтровальная Ф ГОСТ 12026-76), на которые наносили тионин NsW2 семян тинина в концентрации 40 мкг/диск. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с амфотерицином В («НИИ Пастера», 40 мкг/диск) и флуконазолом («НИИ Пастера», 10 мкг/диск). Постановку и оценку результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием пакета статистических программ STATISTICA 6.0, который включал в себя определение меди-

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов к исследуемым генам и условия проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

Ген	Метод ПЦР-РВ	Последовательность праймеров и зондов 5'→3'	Концентрация праймеров и зондов	Условия ПЦР-РВ
<i>hMMP-2</i>	SYBR Green I	Прямой: ACATCAAGGGCATTTCAGGAG Обратный: CTGAGCGATGCCATCAAATA	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 50 циклов: 95°C/15 с, 55°C/35 с и 72°C/40 с
<i>hMMP-7</i>	TaqMan	Прямой: CCATTTAGCAATTATGTCACCCTTTT Обратный: AATAAGACACAGTCAACCATAAAGGA Зонд: FAM-TTGCAGTTGGTTTTTGAATGTCTT TCACTCC-BHQ1	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/13 с, 60°C/45 с
<i>hMMP-9</i>	SYBR Green I	Прямой: TCTTCCCTGGAGACCTGAGA Обратный: ATTTGCACTCTCCACGCATC	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 50 циклов: 95°C/15 с, 58°C/35 с и 72°C/40 с
<i>hMMP-13</i>	TaqMan	Прямой: CCCTTCTTCACACAGACACTAACG Обратный: TAAACAGAATCAAAGGCCACATC Зонд: FAM-ACCACTGCTCTTTTGTCTCCTGTCTTT AAT G-BHQ1	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/13 с, 60°C/45 с
<i>hTIMP-1</i>	SYBR Green I	Прямой: AGACCTACACTGTTGGCTGTGAG Обратный: GACTGGAAGCCCTTTTCAGAG	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 53°C/35 с и 72°C/40 с
<i>hTIMP-2</i>	SYBR Green I	Прямой: ATGCACATCACCTCTGTGA Обратный: CTCTGTGACCCAGTCCATCC	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 53°C/35 с и 72°C/40 с
<i>hRhoA</i>	SYBR Green I	Прямой: CGCTTTTGGGTACATGGAGT Обратный: CAAGCAAGGGCACCCAGATT	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/60 с
<i>b-actin</i>	SYBR Green I	Прямой: CGGGAAATCGTGCCTGAC Обратный: TGGAAGGTGGACAGCGAGG	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/35 с и 72°C/40 с
<i>hIAP-1</i>	SYBR Green I	Прямой: CTACAATGGAGTGCTCATCTG Обратный: CAGCCAGAGGCGATATTCATC	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/2 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/30 с и 70°C/30 с
<i>hNfκBp65</i>	SYBR Green I	Прямой: GTTCACAGACCTGGCATCC Обратный: TGCTACTAGGCGAGTTATAGC	300 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/35 с и 72°C/40 с
<i>miR34a</i>	TaqMan	Прямой: GCGATTGGCAGTGTCTTAGC Обратный: CAGTGCTGGGTCCGAGTGA Зонд: FAM-TCGTATCCAGTGCGAATCACTC-BHQ1	200 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 45 циклов: 94°C/15 с, 60°C/1 мин
<i>miR21</i>	SYBR Green I	Прямой: ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAG ACTGA Обратный: GTGTCTGTGGAGTCGGCAATTC	500 нМ	Предварительная денатурация: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/45 с

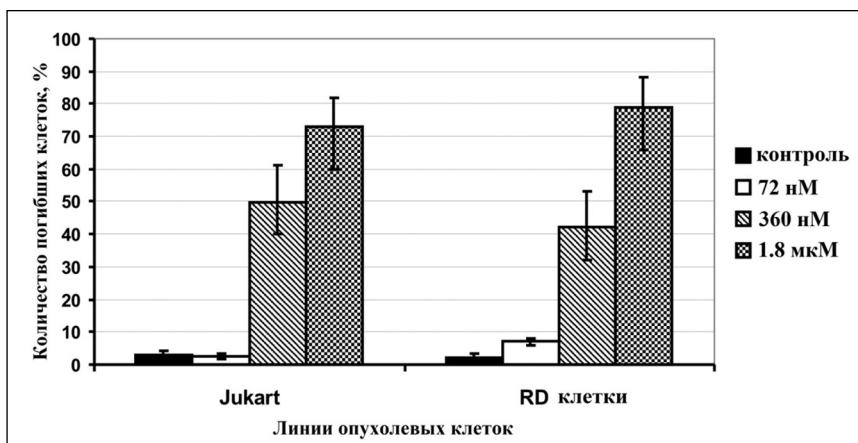


Рис. 1. Уровни выживаемости опухолевых клеток Jukart и RD, обработанных тионином NsW2.

аны и интерквартильного размаха. Для оценки значимости различий в группах применялись непараметрические критерии Манна–Уитни и парный критерий Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$, где p — показатель вероятности ошибки (т.е. достоверности) полученных данных.

Результаты исследований

Выделение тионинов NsW1 и NsW2 из предварительно измельченных и обезжиренных семян чёрного тмина проводили кислотной экстракцией с последующим высаживанием ацетоном. Дальнейшая очистка осуществлялась комбинацией различных методов жидкостной хроматографии (аффинной, эксклюзионной и обращённо-фазовой высокоэффективной) [18]. Для анализа биологического действия был выбран пептид NsW2, содержание которого в семенах было преобладающим.

Цитотоксическая активность тионинов чёрного тмина (*N.sativa*). На основе ранее полученных результатов по антимикробной активности тионинов NsW1 и NsW2, изучаемые молекулы были проверены на наличие цитотоксических свойств. В качестве объектов были использованы линии 4 опухолевых клеток (см. раздел «Материалы и методы»). В первую очередь были отобраны две (RD и Jukart) из четырёх линий, на которых было проверено действие одного из двух гомологичных тионинов (NsW2) в трёх концентрациях методом пятикратного разведения (72, 360 нМ и 1.8 мкМ) с целью выявления у данных соединений наличия/отсутствия целевых свойств. Результаты приведены на рис. 1. Установлено, что на обе выбранные линии раковых клеток изучаемый полипептид проявил ожидаемый эффект, при этом принципиальных различий между ними выявлено не было. Так, при минимальной действующей концентрации (72 нМ) цитотоксическое действие молекулы было примерно на уровне контрольного варианта или немного превышало его (3–8% от общего числа клеток). Однако уже в случае пятикратного увеличения финальной кон-

центрации тионина NsW2 (до 360 нМ), цитотоксичность резко увеличилась и составила 50% (для линии Jukart) и 42% (для линии RD), соответственно. При последующем пятикратном возрастании конечной концентрации (1,8 мкМ) пептида чёрного тмина эффект на обеих линиях усилился (в среднем 72–79% погибших клеток) (рис. 1). Таким образом, в предварительной серии экспериментов на примере одного из гомологов было показано наличие у данных соединений выраженных противоопухолевых свойств по типу цитотоксичности *in vitro*,

причём регистрируемое действие имело характерную зависимость «доза/эффект».

Однако для уточнения полученных результатов, а также определения степени специфичности цитотоксического действия обоих тионинов в сравнительном аспекте, экспериментального определения значений ИК₅₀, была проведена серия аналогичных экспериментов, но с использованием двух других линий опухолевых клеток (AsPC-1 и Colo357), а также более широкого диапазона действующих концентраций (от 94 нМ до 3 мкМ) путём двукратных серийных разведений (рис. 2). В итоге по обеим выбранным клеточным линиям оба пептида продемонстрировали чётко выраженный линейный эффект возрастания уровня биологической активности при увеличении действующей концентрации. Интересно, что в случае линии AsPC-1 существенной разницы между обоими сравниваемыми гомологичными тионинами обнаружено не было (ИК₅₀ для NsW1/2 составила 375 нМ), в то время как по линии Colo357 — эффект действия NsW1 был выражен сильнее (ИК₅₀ для NsW1 также составила 375 нМ, а для NsW2 — 750 нМ). Характерно, что эффект полного ингибирования (ИК100) был достигнут на обеих клеточных линиях, но для AsPC-1 он визуализировался при аппликации 1,5 мкМ каждого тионина, а для Colo357 — только при максимальной тестируемой концентрации (3 мкМ). Полученные данные наглядно демонстрируют разный уровень специфичности тионинов семян чёрного тмина по отношению к опухолевым клеткам, имеющих различную онкологическую природу.

Регуляция экспрессии онкогенов при действии тионинов чёрного тмина (*N.sativa*). Для изучения возможной роли тионинов чёрного тмина (на примере NsW2) на регуляцию (модуляцию) экспрессии были использованы ключевые гены, принимающие активное участие в трансформации нормальной клетки в злокачественную, в её ста-

новление, способность к метастазированию. Для достижения этой цели сравнивали изменение экспрессии генов в клетках линии RD и крови человека. В табл. 2 показаны данные по уровням экспрессии в клетках RD и цельной крови.

В табл. 2 представлены данные по изменению уровня экспрессии генов по сравнению с контрольной группой (значение медианы экспрессии генов у контрольной группы было принято за 1).

В первую очередь можно заключить, что исследуемый пептид различным образом воздействует на количественный уровень экспрессии целевых генов в клетках RD и цельной крови. В клетках RD количественный уровень экспрессии большого числа онкогенов (5 из 10 отобранных для анализа) был достоверно снижен (*MMP-7*, *MMP-13*, *RhoA*, *Mir21*, *IAP-1*), при этом для двух из них — *RhoA* и *IAP-1* — более чем в несколько десятков раз по сравнению с референсными значениями для гена β -актина (табл. 2). Интересно, что уровень экспрессии гена *RhoA* в нормальных клетках, в отличие от RD, активируется (в 1,85 раз), что может приводить к повышенному уровню биосинтеза и накоплению соответствующего продукта — белка Ras-зависимых гуанозинтрифосфатаз [24], тем самым повышая способность нормальных клеток к трансформации в злокачественные, в том числе с

Таблица 2. Влияние тионина NsW2 на экспрессию генов в клетках крови и RD

№	Гены	RD	Кровь
1	<i>MMP-7</i>	5,31↓	—
2	<i>MMP-9</i>	не регистрировалась	—
3	<i>MMP-13</i>	8,72↓	—
4	<i>TIMP-1</i>	не регистрировалась	—
5	<i>TIMP-2</i>	не регистрировалась	—
6	<i>RhoA</i>	45,45↓	1,85↑
7	<i>Mir21</i>	2,22↓	—
8	<i>Mir34</i>	—	—
9	<i>IAP-1</i>	в десятки раз↓	—
10	<i>NF-kB</i>	—	—

Примечание. «↓» — уменьшение содержание мРНК генов; «↑» — увеличения содержание мРНК генов; «—» — не оказывает статистически значимого различия с контролем.

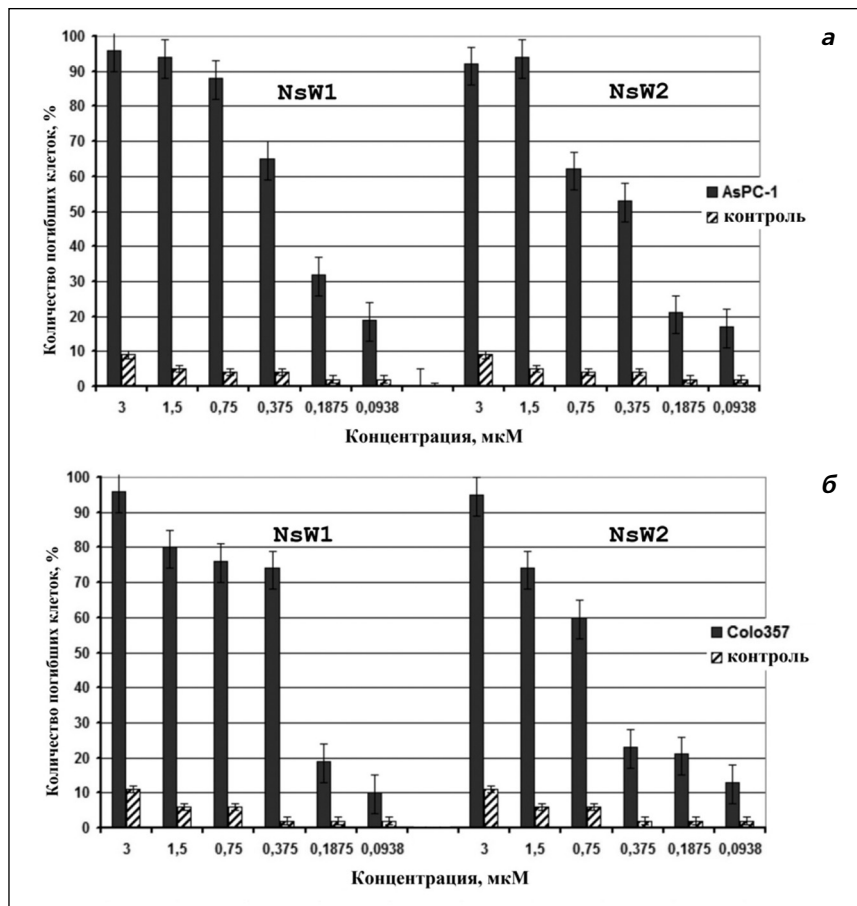


Рис. 2. Уровни выживаемости опухолевых клеток после инкубирования с различными концентрациями тионина NsW2: а — клетки AsPC-1; б — клетки Colo357.

последующим метастазированием опухолей [25]. По всем остальным генам уровень экспрессии в нормальных клетках относительно референсного гена не отличался.

Антифунгальная активность тионинов чёрного тмина (*N.sativa*) на клинических изолятах *Aspergillus* spp. Для определения уровня антимикробной активности тионина NsW2 методом диффузии в агар были использованы клинические изоляты пяти различных видов рода *Aspergillus* (*A.terreus*, *A.flavus*, *A.ochraceus*, *A.fumigatus*, *A.niger*). Для идентификации наличия эффекта ингибирования зоны роста колоний по каждому изоляту была использована нагрузка пептида в расчёте 40 мкг/диск (около 7,7 нмоль), что по массе эквивалентно содержанию стандартного антимикотика — амфотерицина В. Как видно из полученных данных, NsW2 оказывал антимикотическое действие в отношении двух патогенных клинических изолятов, резистентных к препарату из группы азолов (флуконазолу): *A.ochraceus* 497М и *A.fumigatus* 163м на уровне, сопоставимом с амфотерицином В (табл. 3). Остальные три штамма были нечувствительны к тионину в выбранной концентрации.

Таблица 3. Антимикотическая активность тионина NsW2 чёрного тмина (*N.sativa*) в отношении клинических изолятов р. *Aspergillus*

Тест-культуры	NsW2	Флуконазол	Амфотерицин В
<i>A.terreus</i> 1133м	0	0	10,8±0,3
<i>A.flavus</i> 905м	0	0	13,7±0,1
<i>A.ochraceus</i> 497м	9,1±0,1	0	10,1±0,4
<i>A.fumigatus</i> 163м	9,4±0,1	0	9,2±0,1
<i>A.niger</i> 219	0	0	14,1±0,4

Обсуждение результатов

В рамках настоящего исследования проведена детальная характеристика антимикробных пептидов, выделенных из семян чёрного тмина (*N.sativa*) и структурно-охарактеризованных [18]. В первую очередь, были изучены свойства данных пептидов на предмет проявления цитотоксического действия на линии опухолевых клеток *in vitro*. Так, цитотоксическое действие данных тионинов на четыре варианта опухолевых клеток было отмечено на уровне ИК₅₀ в широком диапазоне (0,36—1,8 мкМ), что определяется, главным образом, типом и происхождением каждой конкретной линии. Полученные данные вполне согласуются с результатами других исследователей по изучению действия растительных антимикробных пептидов из этого семейства, вызывающих цитолитический эффект мембран микроорганизмов [26, 27]. Ранее было показано, что некоторые из растительных тионинов демонстрировали цитолитические и противоопухолевые свойства. Например, тионин из растения омела (*Pyrularia pubera*) (UniProtKB/Swiss-Prot ID: P07504.1) проявлял противоопухолевое действие по отношению к линии клеток HeLa при действующей концентрации 50 мкг/мл (около 10 мкМ), при этом цитотоксичность реализовывалась за счёт явления гемолиза [28]. Отдельного упоминания заслуживает группа тионинов — вискотоксинов из видов рода Омела (*Viscum* spp.) — с шестью (а не восьмью) остатками цистеина, формирующих три (а не четыре) дисульфидные связи, и проявляющие выраженные противоопухолевые и цитотоксические свойства. Данные полипептиды представляют собой подсемейство гомологичных молекул, имеющих компактную шпильчатую структуру с двумя α -спиральными участками [29]. Так, вискотоксин В2 из омелы белой (*V.album* L.) проявлял противоопухолевую активность *in vivo* против клеточной линии крысиной остеобластоподобной саркомы при ИК₅₀ на уровне 1,6 мг/мл [30]. Напротив, другие вискотоксины (А1, А2 и А3) были активны по отношению к лимфоцитам человека, по причине того, что они способны индуцировать генерацию активных форм кислорода (АФК) и увеличение проницаемости клеточных мембран [31]. Во-вторую очередь подробно рас-

смотрено влияние одного из тионинов (NsW2) на степень экспрессии генов, контролирующих превращение нормальных клеток в злокачественные в клетках рабдомиосаркомы (RD) человека. Ингибирование генов в клетках RD, обработанных тионином семян чёрного тмина, указывает на преимущественную способность этого пептида подавлять экспрессию целой группы генов, которые могут расцениваться как маркеры в процессах онкогенеза. Можно было предположить, что тионин NsW2, эффективно влияя на экспрессию ряда ключевых генов, изменяет и показатели выживаемости клеток.

Известно, что большая роль в онкогенезе принадлежит генам семейства матриксных протеиназ (МПП), принимающих участие в процессах пролиферации, дифференциации, апоптоза, способности разрушать белки внеклеточного матрикса. МПП могут обеспечивать инвазивный рост опухолевых клеток, пенетрацию в лимфоциты и кровеносные сосуды, метастазирование [32]. Активность МПП в подавляющем большинстве случаев контролируется тканевыми ингибиторами матриксных протеиназ (ТИМП), которые способны блокировать разрушение экстрацеллюлярного матрикса, препятствуя развитию опухолей, метастазированию, ангиогенезу. Как было отмечено ранее, ген *RhoA* контролирует широкий спектр клеточных функций, участвует в процессах трансформации, инвазии, метастазирования опухолей, поэтому он рассматривается как потенциальный онкоген [33]. Ген *NFkB* является транскрипционным фактором, регулируя активность генов, контролирующих пролиферацию и выживание клеток. Активирование этого гена различными экзогенными воздействиями (радиация и др.) сопровождается протекторным действием благодаря включению ряда механизмов, в том числе активации системы цитокинов. [34]. Кроме того, общеизвестно, что огромная роль в регуляции генной активности принадлежит микроРНК, количественная экспрессия двух представителей которых нами исследованы: ген *mir21* относится к онкогенам, а *mir34* — к онко-супрессорам [35].

В серии предыдущих работ нами был испытан β -пуротионин Tk-AMP-BP, выделенный из зерна пшеницы (*Triticum kiharae*) [23], который был охарактеризован как активный антимутаген, снижающий более чем на 80% индуцированные хлоридом кадмия повреждения ДНК в клетках человека [36]. Данное соединение демонстрировало выраженное влияние на экспрессию генов, контролирующих процессы трансформации нормальных клеток в злокачественные в клетках синдрома Дауна, характеризующихся высокой предрасположенностью к развитию лейкозов: в 15 раз выше, чем общепопуляционный уровень [37, 38]. Важно отметить, что данный β -пуротион-

нин обладал также выраженной антиоксидантной активностью на уровне экстракта, из которого он был выделен. Большинство антимутагенов обладают также антиканцерогенными свойствами, которые широко изучены при использовании экстрактов растений. Любопытно отметить, что в основном в качестве природных антимутагенов-антиканцерогенов исследуются экстракты растений. Следует подчеркнуть, что гибель опухолевых клеток в наших экспериментах чётко коррелирует с ингибированием экспрессии исследуемых генов, которая в опухолях разной локализации была повышена.

Следовательно, выбор антиканцерогенного объекта может осуществляться путём исследования влияния препарата на экспрессию ключевых генов, вовлечённых в онкогенез. Таким образом, использование тионинов чёрного тмина, водный и спиртовой экстракты которого ранее охарактеризованы как препараты, снижающие индуцированные канцерогенами опухоли у лабораторных животных [15], может расцениваться как новый подход к профилактике и лечению опухолей. В дополнение к этому, регуляция экспрессии большинства онкогенов в представленной выборке при аппликации данного полипептида, также происходит в сторону снижения при действии ионизирующего (рентгеновского) излучения в дозе до 3 Гр и продолжительностью до 4 ч [39].

Новым направлением в изучении антимикробной (антифунгальной) активности растительных антимикробных пептидов на примере семейства тионинов в рамках настоящей работы являлась проверка их действия на подавление роста клинических изолятов различных видов рода *Aspergillus*, которые были выделены при диагностике пневмомикозов у больных туберкулёзом. Основанием для проведения данной работы явилось наличие выраженной фунгицидной активности по отношению к штамму *A.niger* VKM F-33 у дефензинов чёрного тмина, которая детектировалась на уровне ИК₅₀ при значении 3,5 мкг/мл (около 700 нМ) [17]. Интересно, что при изучении влияния антимикробного пептида семян звездчатки (*Stellaria media* L.), относящегося к другому семейству защитных пептидов растений — α -гарпининам — был отмечен исключительно фунгистатический эффект (задержка роста мицелия), который не зависел от физиологической стадии самих конидий гриба (покоящиеся/проросшие) [40]. Помимо вида *A.niger*, который входит в патогенный комплекс, вызывающий плесневение зерновок злаковых, другой вид данного рода, который является фитопатогенном — это *A.flavus*. Многие изоляты данного вида являются токсигенными и токсинообразующими. В частности в семенах локали-

зован ряд запасных белков, некоторые из которых (из семейства 2S альбуминов) обладают биофункциональным действием, то есть помимо запасной функции, они реализуют также и защитную [41, 42]. Интересно, что из пяти тестируемых изолятов, активность была статистически достоверно показана только на двух (*A.ochraceus* и *A.fumigatus*), что может свидетельствовать о факте специфического влияния полипептидов только на определённые виды за счёт, вероятно, различающегося состава оболочки (клеточной стенки и/или цитоплазматической мембраны) или регуляции на генетическом уровне. Таким образом, приведённые данные могут являться потенциальной основой, объясняющей наличие у растительных полипептидов антимикробной активности против грибов из рода *Aspergillus*.

В заключении можно отметить, что тионины семян чёрного тмина, или чернушки посевной (*N.sativa*) обладают выраженным цитотоксическим действием в отношении спектра линий опухолевых клеток, способны влиять на уровень экспрессии некоторых онкогенов, участвующих в процессах канцерогенеза, преимущественно в сторону снижения, а также ингибировать рост колоний некоторых клинических изолятов видов возбудителей лёгочных аспергиллёзов, устойчивых к антимикотическим препаратам группы азолов.

Полученные данные указывают на то, что исследованные тионины можно расценивать как перспективные антимикотические соединения с противоопухолевыми свойствами, а их высокая токсичность в целом для разнообразных патогенных клеток служит основанием для создания на их основе биологически активных структурно более простых аналогов, которые могут быть использованы для разработки новых антимикробных соединений [43].

Благодарности

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (проекты №№ 13-03-00050-а, 16-34-60217-мол_а_дк) и Программой Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине». Авторы благодарят сотрудников лаборатории химии белков и пептидов Института биоорганической химии им. А. С. Садыхова Академии Наук Республики Узбекистан д.х.н. Вешкурову О.Н. и Ощепкову Ю.И. за предоставленные обезжиренные семена чернушки, с.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН, к.б.н. Свирщевскую Е.В. за проведение опытов по определению цитотоксичности тионинов чёрного тмина на двух линиях опухолевых клеток; Шишкину А.А. за участие в определении количественного уровня экспрессии онкогенов методом ПЦР «в реальном времени».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Stec B.* Plant thionins — structural perspective. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1370—1385.
2. *Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C., Thevissen K., De Samblanx G.W., Osborn R.W.* Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci* 1997; 16: 297—323.
3. *Romero A., Alamillo J.M., Garcia-Olmedo F.* Processing of thionin precursors in barley leaves by a vacuolar proteinase. *Eur J Biochem* 1997; 243: 202—208.
4. *Epple P., Apel K., Bohlmann H.* An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* 1995; 109: 813—820.
5. *Stuart L.S. and Harris T.H.* Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein from unbleached wheat flour. *Cereal Chem* 1942; 19: 288—300.
6. *Bergey D.R., Howe G.A., Ryan C.A.* Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12053—12058.
7. *Bohlmann H., Vignutelli A., Hilpert B., Miersch O., Wasternack C., Apel K.* Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. *FEBS Lett* 1998; 437: 281—286.
8. *Vignutelli A., Wasternack C., Apel K., Bohlmann H.* Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J* 1998; 14: 285—295.
9. *Florack D.E. and Stiekema W.J.* Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol Biol* 1994; 26: 25—37.
10. *Loeza-Ángeles H., Sagrero-Cisneros E., Lara-Zárate L., Villagómez-Gómez E., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A.* Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnol Lett* 2008; 10: 1713—1719.
11. *Steenkamp V., Grimmer H., Semano M., Gulumian M.* Antioxidant and genotoxic properties of South African herbal extracts. *Mutat Res* 2005; 581: 35—422.
12. *Arashanyan E.B.* Sistemnye kletochnye mekhanizmy protivopuch-holevoy aktivnosti rastitel'nykh adaptogenov. *Voprosy onkologii* 2009; 55: 1: 15—22 (in Russian).
13. *Agabeili R.A.* Genetic effects of root extracts of *Glycyrrhiza glabra* L. in different test systems. *Cytol Genet* 2012; 46: 5: 297—301.
14. *Vasilyeva I.M., Zasukhina G.D.* Comparison of the protective effect of garlic extract and cell defense during adaptive response. *Russ J Gen* 2002; 38: 3: 335—337.
15. *Linjawi S.A.A., Khalil W.K.B., Hassanane M.M., Ahmed E.S.* Evaluation of the protective effect of *Nigella sativa* extract and its primary active component thymoquinone against DMBA-induced breast cancer in female rats. *Arch Med Sci* 2013; 10: 1—10.
16. *Ощепкова Ю.И., Вешкурова О.Н., Рогожин Е.А., Мусолямов А.Х., Смирнов А.Н., Одинова Т.И., Егоров Ц.А., Гришин Е.В., Салихов Ш.И.* Выделение липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной (*Nigella sativa*). *Биоорган хим* 2009; 35: 3: 344—349. / *Oshchepkova Ju.I., Veshkurova O.N., Rogozhin E.A., Musolyamov A.H., Smirnov A.N., Odincova T.I., Egorov C.A., Grishin E.V., Salikhov Sh.I.* Vydelenie lipid-perenosyashhego belka Ns-LTP1 iz semjan chernushki posevnoj (*Nigella sativa*). *Bioorgan him* 2009; 35: 3: 344—349. [in Russian]
17. *Rogozhin E.A., Oshchepkova Y.I., Odintsova T.I., Khadeeva N.V., Veshkurova O.N., Egorov T.A., Grishin E.V., Salikhov S.I.* Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. *Plant Physiol Biochem* 2011; 49: 2: 131—137.
18. *Vasilchenko A.S., Smirnov, A.N., Zavriev, S.K., Grishin E.V., Vasilchenko A.V., Rogozhin E.A.* *Int J Pept Res Ther* 2016. doi:10.1007/s10989-016-9549.
19. *Клишко Н.Н.* Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп. М.: Ви Джи Групп, 2008; 336. / *Klimko N.N.* Mikozy: diagnostika i lechenie. *Rukovodstvo dlja vrachej*. 2-e izd. pererab. i dop. M.: Vi Dzhi Grupp, 2008; 336. [in Russian]
20. *Кулько А. Б.* Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* - возбудителей бронхолегочных инфекций. М.: МНПЦБТ, 2012; 160. / *Kul'ko A. B.* Atlas uslovno-patogennykh gribov roda *Aspergillus* - возбуdiviteley bronhologochnykh infekcij. M.: MNPCBT, 2012; 160. [in Russian]
21. *Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. (Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.)* Определитель патогенных и условно патогенных грибов: Пер. с англ. М.: Издательство Мир. 2001; 468. / *Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.* (Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.) *Opredelitel' patogennykh i uslovno patogennykh gribov*: Per. s angl. M.: Izdatel'stvo Mir. 2001; 468. [in Russian]
22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.0, valid from 2015-11-16, 2015.
23. *Egorov T.A., Odintsova T.I., Pukhalsky V.A., Grishin E.V.* Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides* 2005; 26: 11: 2064—2073.
24. *Etienne-Manneville S., Hall A.* Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420: 6916: 629—635.
25. *Kamai T., Kawakami S., Koga F. et al.* RhoA is associated with invasion and lymph node metastasis in upper urinary tract cancer. *BJU Int* 2003; 91: 3: 234—238.
26. *Thevissen K., Ghazi A., De Samblanx G.W., Brownlee C., Osborn R.W., Broekaert W.F.* Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol Chem* 1996; 271: 25: 15018—15025.
27. *Thevissen K., Terras F.R., Broekaert W.F.* Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol* 1999 Dec; 65: 12: 5451—5458.
28. *Evans J., Wang Y.D., Shaw K.P., and Vernon L.P.* Cellular responses to *Pyricularia* thionin are mediated by Ca²⁺ influx and phospholipase A2 activation and are inhibited by thionin tyrosine iodination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5849—5853.
29. *Pal A., Debreczeni J.E., Sevvana M., Gruene T., Kahle B., Zecek A., Sheldrick G.M.* Structures of viscotoxins A1 and B2 from European mistletoe solved using native data alone. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2008, 64: Pt 9: 985—992.
30. *Kong J.L., Du X.B., Fan C.X., Xu J.F., Zheng X.J.* Determination of primary structure of a novel peptide from mistletoe and its antitumor activity. *Acta Pharmaceutica Sinica* 39 (2004) 813—817.
31. *Guzmán-Rodríguez J.J., Ochoa-Zarzosa A., López-Gómez R., and López-Meza J.E.* Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents, *BioMed Research International* (2015) dx.doi.org/10.1155/2015/735087.
32. *Keller U., Doucet A., Overall C.* Protease research in the era of system biology. *Diol Chem* 2007; 388: 11: 1159—1162.
33. *Wang Y., Erickson J., Fuji R. et al.* Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Res* 2010; 18: 3: 207—219.
34. *Li X., Gao L., Cui Q., Gary B.D., Dyess D.L., Taylor W., Shevde L.A., Samant R.S., Dean-Colomb W., Piazza G.A., Xi Y.* Silindac inhibits tumor cell invasion by suppressing N7kB-mediated transcription of microRNAs. *Oncogene* 2012; 31: 4979—4986.
35. *Erson-Bensan A.* Introduction to microRNAs in biological systems. *MicroRNA biology and computational analysis*. Springer Sci. N.Y., 2014; 1107: 1—14.
36. *Одинова Т.И., Васильева И.М., Коростылева Т.В., Уткина Л.Л., Славохотова А.А., Рогожин Е.А., Шиян А.А., Пухальский В.А., Засухина Г.Д.* Антимутагенная активность β-пуротонина Tk-AMP-BP пшеницы. *Генетика* 2011; 47: 9: 1267—1270. / *Odincova T.I., Vasil'eva I.M., Korostyleva T.V., Utkina L.L., Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Shijan A.A., Puhalskij V.A., Zasuhina G.D.* Antimutagennaya aktivnost' β-purotionina Tk-AMP-BP pshenicy. *Genetika* 2011; 47: 9: 1267—1270. [in Russian]
37. *Засухина Г.Д., Шагирова Ж.М., Бабинцев М.В., Васильева И.М., Рогожин Е.А., Одинова Т.И., Михайлов В.Ф., Громов С.П., Ведерников А.И., Алфимов М.В.* Модуляция антимутагенами экспрессии генов в клетках человека, различающихся по чувствительности к мутагенам. Доклады Академии Наук, 2013; 453: 1: 99—101. / *Zasuhina G.D., Shagirova Zh.M., Babincev M.V., Vasil'eva I.M., Rogozhin E.A., Odincova T.I., Mihajlov V.F., Gromov S.P., Vedernikov A.I., Alfimov M.V.* Moduljacija antimutagenami jekspressii genov v kletkah cheloveka, razlichajushhihsja po chuvstvitel'nosti k mutagenam. *Doklady Akademii Nauk*, 2013; 453: 1: 99—101. [in Russian]
38. *Засухина Г.Д., Шишкина А.А., Васильева И.М., Рогожин Е.А., Михайлов В.Ф., Раева Н.Ф., Шуленина Л.В., Громов С.П., Алфимов М.В.* Сравнительный анализ экспрессии генов в клетках крови и опухолевых клетках человека, обработанных антимутагенами. Доклады Академии Наук 2014; 457: 6: 1—3. / *Zasuhina G.D., Shishkina A.A., Vasil'eva I.M., Rogozhin E.A., Mihajlov V.F., Raeva N.F., Shulenina L.V., Gromov S.P., Alfimov M.V.* Sravnitel'nyj analiz jekspressii genov v kletkah krvi i opuholevykh kletkah cheloveka, obrabotannykh antimutagenami. *Doklady Akademii Nauk* 2014; 457: 6: 1—3. [in Russian]
39. *Михайлов В.Ф., Шишкина А.А., Васильева И.М., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Рогожин Е.А., Старцев М.И., Засухина Г.Д., Громов С.П., Алфимов М.В.* Сравнительный анализ природных и синтетических антимутагенов как регуляторов экспрессии генов в клетках человека при воздействии ионизирующего излучения. *Генетика* 2015; 51: 2: 147—155. / *Mihajlov V.F., Shishkina A.A., Vasil'eva I.M., Shulenina L.V., Raeva N.F., Rogozhin E.A., Starcev M.I., Zasuhina G.D., Gromov S.P., Alfimov M.V.* Sravnitel'nyj analiz prirodnykh i sinteticheskikh antimutagenov kak reguljatorov jekspressii genov v kletkah cheloveka pri vozdejstvii ionizirujushhego izlucheniya. *Genetika* 2015; 51: 2: 147—155. [in Russian]
40. *Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., Andreev Y.A., Oparin P.B., Berkut A.A., Vassilevski A.A., Egorov T.A., Grishin E.V., Odintsova T.I.* Novel antifungal α-hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution. *Plant Mol Biol* 2014; 84: 1—2: 189—202.
41. *Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Sklyar I.V., Musolyamov A.K., Kudryavtsev A.M., Pukhalsky V.A., Smirnov A.N., Grishin E.V. and Egorov T.A.* Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. *Protein & Peptide Letters* 2010; 17: 522—529.

42. Duan XH, Jiang R, Wen YJ, Bin JH. Some 2S albumin from peanut seeds exhibits inhibitory activity against *Aspergillus flavus*. Plant Physiol Biochem 2013; 66: 84–90.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кулько Александр Борисович — к.б.н., в.н.с. отдела проблем лабораторной Диагностики туберкулёза и патоморфологии Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы

Кисиль Ольга Валерьевна — к.х.н., и.о. ученого секретаря ФГБНУ «НИИНА им. Г.Ф.Гаузе», Москва

Садыкова Вера Сергеевна — д.б.н., в.н.с. лаборатории Химического изучения биологически активных соединений микробного происхождения НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе, Москва

Михайлов Владимир Федорович — к.б.н., заведующий отделом Экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины Государственного унитарного предприятия Государственный научный центр Российской Федерации Институт биофизики Федерального Медико-биологического Агентства, Москва

Васильева Ия Михайловна — к.б.н., с.н.с., группы мутагенеза и репараций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики

43. Vila-Perello M., Tognon S., Sanchez-Vallet A., Garcia-Olmedo F., Molina A., Andreu D. A minimalist design approach to antimicrobial agents based on a thionin template. J Med Chem 2006; 49: 448–451.

им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва

Шуленина Лилия Викторовна — к.б.н., н.с. отдела Экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины Государственного унитарного предприятия Государственный научный центр Российской Федерации Институт биофизики Федерального Медико-биологического Агентства, Москва

Засухина Галина Дмитриевна — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, группы мутагенеза и репараций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва

Рогожин Евгений Александрович — к.х.н., н.с. лаборатории Нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

Молекулярные механизмы снижения чувствительности к цефтаролину метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus*

В. В. ГОСТЕВ¹, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ¹, О. А. ДМИТРЕНКО², И. А. ЦВЕТКОВА¹, С. В. СИДОРЕНКО^{1,3}

¹ ФГБУ «НИИ детских инфекций ФМБА России», Санкт-Петербург

² Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи, Москва

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

Molecular Mechanisms of Ceftaroline Susceptibility Reduction in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

V. V. GOSTEV¹, O. S. KALINOGORSKAYA¹, O. A. DMITRENKO², I. A. TSVETKOVA¹, S. V. SIDORENKO^{1,3}

¹ Scientific Research Institute of Children's Infections, Saint-Petersburg

² Research Centre of Epidemiology and Microbiology named After Honoured Academician N. F. Gamalei, Moscow

³ North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg

Цефтаролин — уникальный цефалоспори́н с активностью в отношении метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) одобрен для клинического использования в США, Европе и России в 2010 году для терапии инфекций кожи и мягких тканей, а также внебольничных пневмоний. В настоящем исследовании было проведено молекулярное типирование 24 изолятов MRSA со сниженной чувствительностью к цефтаролину. Для 8 изолятов разных генетических линий (ST8, ST239, ST228) и разным уровнем МПК были определены уровни концентраций антибиотика, предотвращающих образование устойчивых мутантов (mutant prevention concentration, MPC) и диапазоны окна селекции (mutant selection window, MSW). Установлено, что подавляющее большинство изолятов со сниженной чувствительностью к цефтаролину (МПК = 2 мкг/мл) относилось к клональной линии ST228. Полногеномное секвенирование двух изолятов ST228 показало, что они относятся к эпидемической «Южно-Германской» генетической линии, характеризуются наличием мутаций в PBP2a (N146K) и PBP2 (C197Y), обуславливающих снижение чувствительности. Наиболее высокие показатели MPC = 32 мкг/мл и MSW (2—16 мкг/мл) были выявлены среди клинических изолятов, относящихся к генетической линии ST8. Для изолятов ST239 и ST228 окно селекции было в диапазоне 2—4 мкг/мл. Не было обнаружено зависимости уровней МПК и MPC / MSW.

Ключевые слова: цефтаролин, MRSA, устойчивость, ST228, минимальная концентрация антибиотика, предотвращающая образование устойчивых мутантов, окно селекции мутантов.

Ceftaroline is a unique cephalosporin with activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). It was approved for clinical use in the USA, Europe and Russian Federation since 2010 for the treatment of the skin and soft tissue infection and community-acquired pneumoniae. In the present study there was used molecular typing of 24 isolates of MRSA with reduced susceptibility to ceftaroline. For 8 isolates belonging to different genetic lines (ST8, ST239 and ST228) and requiring MICs there were determined antibiotic concentrations preventing formation of resistant mutants (mutant prevention concentration) and the ranges of the mutant selection window (MSW). The last majority of the isolates with reduced susceptibility to ceftaroline (MIC of 2 mcg/ml) belonged to the clonal line ST228. The whole genome sequencing of two isolates of ST228 showed that they belonged to the epidemic South Germany genetic line and were characterized by the presence of mutations in PBP2a (N146K) and PBP2 (C197Y) responsible for reduced susceptibility. The highest rates of MPC (32 mcg/ml) and MSW (2—16 mcg/ml) were observed in the clinical isolates belonging to the genetic line ST8. The isolates of ST239 and ST228 had the selection window within 2—4 mcg/ml. No dependence of the MIC and MPC/MSW levels was detected.

Keywords: ceftaroline, MRSA, resistance, ST228, mutant prevention concentration, mutant selection window.

Введение

Цефтаролин — антибиотик широкого спектра действия, один из первых цефалоспоринов с уникальной активностью в отношении метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA). Препарат был одобрен для клинического использования

в США, Европе и России в 2010 г. для терапии инфекций кожи и мягких тканей, а также внебольничных пневмоний [1]. Цефтаролин способен связываться с белком PBP2a, таким образом проявляя свою активность в отношении MRSA. Несмотря на уникальные свойства, практически сразу же после внедрения антибиотика в клиническую практику появились сообщения о выделении устойчивых к нему изолятов MRSA. В недавнем исследовании нами было установлено, что среди циркулирующих

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9. НИИ детских инфекций

в России MRSA, 5% имеют сниженную чувствительность к цефтаролину с МПК > 1 мкг/мл [2].

У MRSA выделяют несколько механизмов устойчивости к этому антибиотику. Так, мутации в аллостерическом домене белка RBP2a (*mecA*) опосредуют снижение чувствительности до МПК 2 мкг/мл. Высокий уровень устойчивости связан с формированием мутаций в транспептидажном домене RBP2a. Помимо этого, описано еще три потенциальных механизма устойчивости: мутации в пенициллинсвязывающем белке RBP4 [3], накопление в клетке вторичных мессенджеров цикло-ди-аденозинмонофосфатов (с-ди-АМР), и гиперэкспрессия неспецифического эффлюксного насоса (*acrB*) [4, 5].

Важной особенностью резистентности к цефтаролину является её преимущественное распространение среди изолятов, относящихся к эпидемическому «Южно-Германскому» или «Итальянскому» клону (генотип: ST228-t041-SCC*mec* IA). К этому клону относились большинство устойчивых изолятов, собранных в Европе и Азии в рамках международной программы AWARE (Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance Evaluation) [6]. Устойчивость к антибиотику, связанная с мутацией (N146K) в аллостерическом домене RBP2a (*mecA*) была обнаружена у изолятов «Южно-Германского» клона, выделенных ещё до внедрения цефтаролина в практику [7]. Для «Южно-Германского» клона характерны как способность вызывать вспышки госпитальных инфекций [8], так и бессимптомное носительство [9].

Формирование устойчивости к цефтаролину происходит через этап гетерорезистентности, с образованием в чувствительной популяции, минорной субпопуляции, проявляющей устойчивость [10]. Определение минимальной концентрации антибиотика, предотвращающей образование резистентных мутантов (mutant prevention concentration, MPC) является одним из способов определения потенциальной гетерорезистентности. Для определения MPC используют существенно более высокую концентрацию бактерий (более 10¹⁰ КОЕ/мл), чем при стандартном определении МПК, что позволяет выявить единичные устойчивые клетки. Зная уровни МПК и MPC можно выделить зону концентраций антибиотика, при которых будет происходить селекция устойчивости в популяции — это окно селекции мутантов (mutant selection window, MSW). Сопоставление MSW с фармакокинетическими параметрами конкретного препарата позволяет прогнозировать риски формирования устойчивости на фоне лечения и, как следствие, исход антибактериальной терапии.

Целью данной работы было выявление связей MRSA со сниженной чувствительностью к цефтаролину, циркулирующих на территории Рос-

сийской Федерации, с генетическими линиями из других географических регионов, расшифровка генетических механизмов снижения чувствительности, а также определение значений MPC цефтаролина как показателя гетерорезистентности к указанному антибиотику.

Материал и методы

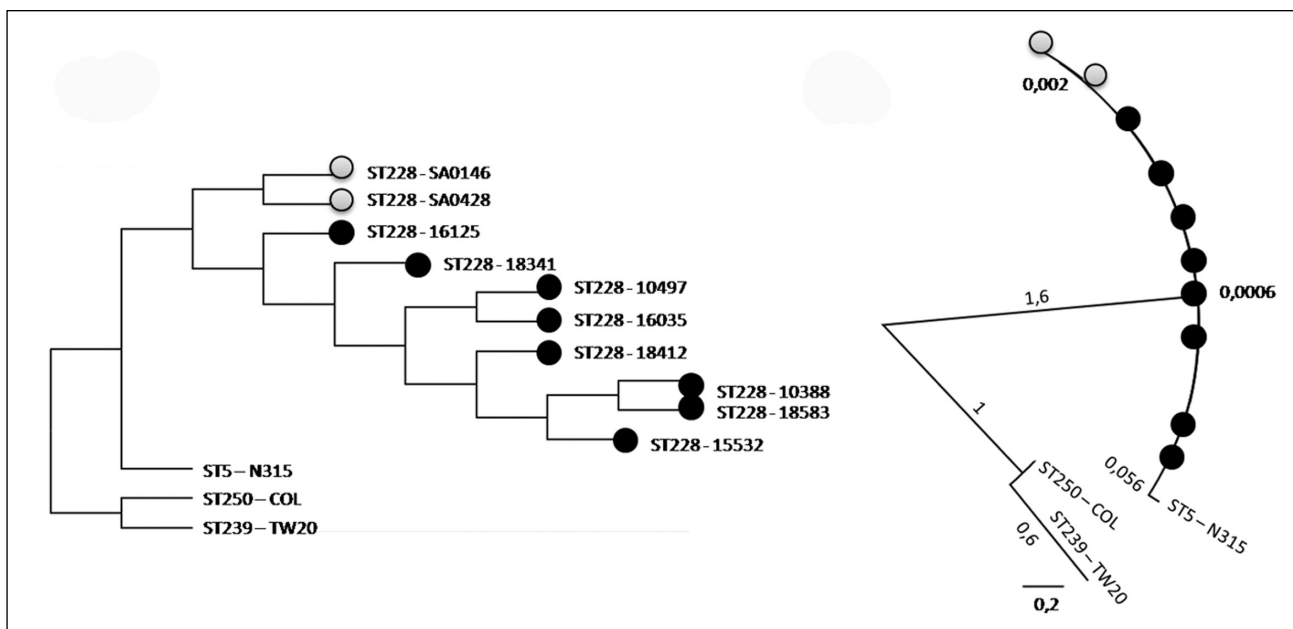
Бактериальные изоляты и определение антибиотикочувствительности. Бактериальные изоляты MRSA, включённые в исследование, были восстановлены из коллекции бактериальных культур НИИДИ (хранение при –80°C в среде с 30% глицерина) и реидентифицированы на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany).

Антибиотикочувствительность оценивали методом серийных микроразведений в бульоне Мюллера–Хинтон (Bio-Rad, France) с определением МПК в соответствии с ISO 20776-1 [11]. Постановку опыта проводил в 96 луночных планшетах (НПО «Медполимер», Санкт-Петербург). В качестве контрольного штамма был использован *S.aureus* ATCC 29213 (RemelCulti-Loops®, США).

Определение MPC. Определение MPC проводили по модифицированной методике, описанной в [12, 13]. Культуры *S.aureus* выращивали на кровяном агаре для получения суточного сливного роста на двух чашках Петри. Далее всю биомассу с двух чашек переносили в 100 мл бульона Мюллера–Хинтон (Bio-Rad, France) и дополнительно инкубировали в орбитальном шейкер-инкубаторе (bioSan, Латвия) 2,5 ч при 37°C и 250 об/мин. Клеточную биомассу концентрировали центрифугированием в течение 5 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре, таким образом, чтобы концентрация клеток составляла более 10¹⁰ КОЕ/мл в объёме 2 мл стерильного физиологического раствора. КОЕ определяли с помощью серийных 10-кратных разведений с последующими высевами на триптиказо-соевый агар TSA (Merck, Germany) и визуальным подсчётом выросших колоний. После валидации клеточных концентраций готовили *ex tempore* серийные разведения цефтаролина (AstraZeneca, UK) в чашках с сердечно-мозговым агаром (Merck, Germany) в диапазоне конечных концентраций антибиотика от 0,25 до 64 мкг/мл. Инокулом в объёме 0,1 мл переносили на среды с антибиотиком и осуществляли посев газонном. Посевы инкубировали в течение 72 ч при 37°C. Опыт проводили в трёх повторностях. За MPC принимали минимальную концентрацию антибиотика, при которой полностью отсутствовал рост исследуемой культуры, за MSW принимали диапазон значений концентраций между МПК и MPC.

Молекулярное типирование. Определение типа SCC*mec* осуществляли в соответствии с рекомендациями [14] с помощью ПЦР. Мультилокусное секвенс-типирование (MLST) и секвенирование фрагмента гена *sra* (*sra*-типирование) проводили по стандартным протоколам, представленных, соответственно на <http://pubmlst.org/saureus/> и <http://www.spaserver.ridom.de>. Секвенирование проводили по Сэнгеру на приборе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Japan) с прямыми и обратными прочтениями. Для анализа секвенсов фрагмента *sra*-гена использовали программы DNAGear [15] и *sra*-typer 1.0 [16].

Полногеномное секвенирование. Два изолята были отобраны для геномного секвенирования. Перед выделением геномной ДНК, культуры рассевали на кровяной агар для получения единичных колоний, после этого, одну колонию переносили в 20 мл сердечно-мозгового бульона (bioMérieux, Франция) для получения ночного инокулюма. Ночной инокулом в объёме 1 мл осаждали центрифугированием 5 мин при 5000 об/мин. Клеточный осадок лизировали в присутствии 5 мг/мл лизостафина (Sigma Aldrich, USA) и 100 мг/мл лизоцима (Amresco, USA) в трис — ЭДТА буфере в течение 60 мин при 37°C. Для выделения геномной ДНК из полученного лизата использовали набор GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher



Результаты филогенетического анализа, полученных при выравнивании геномов (а — кладограмма; б — филограмма).

В анализ были включены: 8 геномов изолятов ST228, выделенных в 2008–2012 гг. в Лозанне при вспышке внутрибольничной инфекции (круги с чёрной заливкой) [8]; геномы двух изолятов ST228, выделенных в России (круги с серой заливкой); два контрольных генома разных генетических линий (ST250 — COL, ST239 — TW20) и референс-геном ST5 — N315. Значения, указанные на филограмме соответствуют эволюционной дистанции. Для редакции филогенетических деревьев была использована программа FigTree 1.4.2.

Scientific, Lithuania) по протоколу производителя. Полногеномное секвенирование проводили на платформе Miseq (Illumina, USA). Использовали пул библиотек ДНК, приготовленных с помощью набора Nextera XT с последующим получением парноконцевых ридов размером 2×250 п.н. (ver.2 Illumina kit). Все этапы секвенирования проводили в соответствии с протоколами производителя. Среднее покрытие геномов составило для двух изолятов ×30 и ×70.

Программы для анализа данных полногеномного секвенирования. Сборку геномов осуществляли с помощью SPAdes 3.5.0 [17] после предварительного анализа и редакции ридов в программах FastQC и Trimmomatic [18]. Для характеристики геномов использовали онлайн-сервис Center for Genomic Epidemiology [19–21]. Риды полногеномного запуска зарегистрированы в NCBI BioProject под номером PRJNA325350.

Результаты и обсуждение

Молекулярная характеристика изолятов со сниженной чувствительностью к цефтаролину. Для молекулярного типирования были отобраны, выявленные в предыдущем исследовании изоляты MRSA ($n=24$) со сниженной чувствительностью к цефтаролину [2]. Большинство изолятов (13/24) относились к клональному комплексу (CC) CC5, сиквенс-типу (ST) ST228, спра-типу t041 и имели стафилококковую мес-кассету SCCmec IA (ST228-t041-SCCmec IA), совокупность представленных свойств позволила отнести указанные изоляты к «Южно-Германскому» клону. Остальные изоляты соответственно относились к CC8: ST239-t632-SCCmec III.1 (5/24), ST239-t030/t037-SCCmec III.1 (4/24) и ST8-t008-SCCmec IVce (2/24).

Два изолята, относящихся к «Южно-Германскому» клону были отобраны для геномного секвенирования с целью детальной характеристики представителей этой генетической линии. Изолят SA0146 был получен из стационара Санкт-Петербурга от больного с остеомиелитом в 2011 г., изолят SA0428 выделен в Мурманске от больного с хронической обструктивной болезнью лёгких в 2013. Было установлено, что геномы изолятов различались между собой только на 90 нуклеотидных полиморфизмов, несмотря на различия в месте и времени их выделения. При сравнении с доступными нуклеотидными последовательностями полных геномов ST228, была установлена высокая степень нуклеотидной и геномно-структурной гомологии, при этом максимальное количество нуклеотидных замен в сравнении с Российскими изолятами составляло не более 700 на геном. Проведённое выравнивание геномов показало, что все изоляты ST228 входят в одну кладу (рисунок, а) и при этом эволюционная дистанция между ними была не более 0,002 (расчёты сделаны в программе CSIPhylogeny 1.4), филогенетический анализ представлен на рисунке, б. Полученные данные подтверждают вероятность импорта эпидемического «Южно-Германского» клона на территорию Российской Федерации.

Резистомы изолятов были представлены следующими детерминантами: устойчивость к

Результаты определения МРС для изолятов с разными значениями МПК цефтаролина

Изолят	Год выделения	Генотип	МПК	МРС ₉₀	MSW (МРС/МІС)
ATCC29213	—	ST5-t002	0,5	0,5	—
SA0520	1998	ST8-t008-SCCmec IVce	0,25	0,25	—
SA0422	2011	ST8-t008-SCCmec IVce	2	32	4—16
SA0077	2011	ST8-t008-SCCmec IVce	1	32	2—16
SA0085	2011	ST239-t632-SCCmec III.1	1	8	2—4
SA0420	2011	ST239-t632-SCCmec III.1	2	8	4
SA0146	2011	ST228-t041-SCCmec IA	2	4	2
SA0428	2013	ST228-t041-SCCmec IA	2	8	4

аминогликозидам детерминирована четырьмя аминогликозид-модифицирующими ферментами (гены *sps*, *aphA3*, *aac(6')-aph(2'')*, *aadD*), устойчивости к макролидам и линкозамидам — геном метилазы *ermA*. Устойчивость к фторхинолонам обусловлена мутациями в *gyrA* (S84L, P326L, A457T), *gyrB* (C196A, T336C, C1239T) и генах *parCE*. У изолятов выявлена плазмида (размер около 30 тыс п.н.) группы *rep20/rep21*, в состав которой входили комплекс генов бета-лактамазы *blaZ*, *blaR*, а также гены устойчивости к антисептикам — эффлюксная система *qacAR*, гены устойчивости к солям меди (*copA*) и ртути (*mer*).

При анализе генов, участвующих в биосинтезе пептидогликана в пенициллинсвязывающих белках PBP2a (*tesA*) и PBP2 были обнаружены миссенс-мутации (N146K и C197Y). Аминокислотные замены G233D и V363I были также идентифицированы в регуляторном гене биогенеза клеточной стенки *walK*, и синтазе *murF*, участвующей в цитоплазматическом биосинтезе пептидных мостиков. Стоит отметить, что нуклеотидные последовательности геномов ST228, доступных в NCBI GenBank, характеризуются наличием вышеперечисленных мутаций, за исключением замены в *murF* (V363I), которая была уникальна для Российских изолятов.

Ранее роль мутаций в *tesA* была изучена по данным рентгенокристаллографического анализа. Так, было показано, что молекула цефтаролина взаимодействует сразу с двумя доменами белка PBP2a, аллостерическим и транспептидазным [22]. Поэтому при возникновении мутаций только в аллостерическом домене, цефтаролин связывается с транспептидазным доменом, что приводит к снижению МПК только до 2 мкг/мл, но как только происходят изменения в активном центре белка (например, замены в позициях Y446N и E447K), происходит повышение МПК до высоких значений. Несмотря на существующие критерии оценки чувствительности, недавние исследования, проведенные по изучению фармакокинетики и фармакодинамики, показывают, что стандартные дозировки препарата преодолевают уровень МПК в 2 мкг/мл [23, 24].

Виром был представлен генами гемолизина (*hlgABC*, *hlga*, *hlgb*), лейкоцидинов (*lukDE*), энтеротоксинов (*seo*, *seg*, *sen*, *sei*, *seu*) и комплексом *immune evasion cluster* типа D (*sea*, *sak*, *scn*).

Определение МРС и MSW цефтаролина. Для эксперимента были отобраны 8 изолятов с МПК цефтаролина от 0,25 до 2 мкг/мл, относящихся к нескольким генетическим линиям, а также референсный штамм ATCC29213. Результаты определения МРС представлены в таблице. Максимальным значением МРС=32 мкг/мл характеризовались два изолята, принадлежащих к широко распространённому в России генотипу, ST8-t008-SCCmec IVce. При этом окно селекции (MSW) для этих изолятов было в широком диапазоне и составляло 2—16 мкг/мл. Такие данные свидетельствуют о высокой потенциальной возможности формирования устойчивости к цефтаролину у данного генотипа.

Наряду с этим, один изолят относящийся к этому же клону, но выделенный в 1998 г. характеризовался очень низким значением МРС (0,25 мкг/мл), и при этом МПК также составила 0,25 мкг/мл. Это свидетельствует об отсутствии гетерорезистентности и, соответственно, низкой вероятности формирования мутантов. Для генотипов ST228-t041-SCCmec IA и ST239-t632-SCCmec III.1 уровень МРС составлял 4—8 мкг/мл с окном селекции 2—8 мкг/мл. Не было обнаружено зависимости уровня МПК от значения МРС.

Заключение

Таким образом, большинство изолятов MRSA со сниженной чувствительностью к цефтаролину, относятся к генетической линии ST228 — t041 — SCCmec IA, ранее не описываемой в России. Данная генетическая линия имеет Европейское происхождение, что было подтверждено сравнительным анализом геномов. Повышение МПК до 2 мкг/мл связано с наличием мутаций в *tesA* (N146K) и *pbp2* (C197Y), рассматриваемых как первичный этап формирования устойчивости.

Определение параметров МРС является важным исследованием для микроорганизмов, механизмы резистентности которых связаны с формированием мутаций. Полученные данные

свидетельствуют о высокой вероятности появления устойчивости к цефтаролину среди изолятов доминирующей Российской генетической линии ST8-t008-SCCmec IVce.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Laudano J.B.* Ceftaroline fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: Suppl 3: iii11–18.
2. *Gostev V.V., Kalinogorskaya O.S., Popenko L.N., Chernenkaya T.V., Naumenko Z.S., Voroshilova T.M., Zakharova Y.A., Khokhlova O.E., Kruglov A.N., Ershova M.G. et al.* Antibiotic Resistance of MRSA in the Russian Federation. *Antibiot Khimioter* 2015, 60: 3–9.
3. *Lahiri S.D., Alm R.A.* Identification of non-PBP2a resistance mechanisms in *Staphylococcus aureus* after serial passage with ceftaroline: involvement of other PBPs. *J Antimicrob Chemother* 2016.
4. *Greninger A.L., Chatterjee S.S., Chan L.C., Hamilton S.M., Chambers H.F., Chiu C.Y.* Whole-genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to fifth-generation cephalosporins reveals potential non-mecA mechanisms of resistance. *PLoS One* 2016, 11: e0149541.
5. *Banerjee R., Gretes M., Harlem C., Basuino L., Chambers H.F.* A mecA-negative strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level beta-lactam resistance contains mutations in three genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4900–4902.
6. *Mendes R.E., Tsakris A., Sader H.S., Jones R.N., Biek D., McGhee P., Appelbaum P.C., Kosowska-Shick K.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* displaying increased MICs of ceftaroline. *J Antimicrob Chemother* 2012.
7. *Kelley W.L., Jousset A., Barras C., Lelong E., Renzoni A.* Missense mutations in PBP2A affecting ceftaroline susceptibility detected in epidemic hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonotypes ST228 and ST247 in Western Switzerland archived since 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 1922–1930.
8. *Vogel V., Falquet L., Calderon-Copete S.P., Basset P., Blanc D.S.* Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST228) in a tertiary care hospital. *PLoS One* 2012; 7: e38969.
9. *Senn L., Clerc O., Zanetti G., Basset P., Prod'homme G., Gordon N.C., Sheppard A.E., Crook D.W., James R., Thorpe H.A. et al.* The stealthy superbug: the role of asymptomatic enteric carriage in maintaining a long-term hospital outbreak of ST228 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio* 2016; 7: e02039–02015.
10. *Saravolatz S.N., Martin H., Pawlak J., Johnson L.B., Saravolatz L.D.* Ceftaroline-heteroresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 3133–3136.
11. INTERNATIONAL STANDARD ISO 20776-1. 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.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

Калиногорская Ольга Серафимовна — к.м.н., научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Дмитренко Ольга Александровна — д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатории молекулярных основ патогенности (с группой стафилококковых инфекций) отдела бактериальных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Москва

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

12. *Dong Y., Zhao X., Domagala J., Drlica K.* Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1756–1758.
13. *Blondeau J.M.* New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Vet Dermatol* 2009; 20: 383–396.
14. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4961–4967.
15. *Brunel A.S., Bouzinbi N., Corne P., Banuls A.L., Shahbazkia H.R.* DNAGear — a free software for spa type identification in *Staphylococcus aureus*. *BMC Res Notes* 2012; 5: 642.
16. *Bartels M.D., Petersen A., Worning P., Nielsen J.B., Larner-Svensson H., Johansen H.K., Andersen L.P., Jarlov J.O., Boye K., Larsen A.R., Westh H.* Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 4305–4308.
17. *Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A.A., Korobeynikov A., Lapidus A., Prjibelski A.D., Pyshkin A., Sirotkin A., Sirotkin Y. et al.* Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol* 2013; 20: 714–737.
18. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30: 2114–2120.
19. *Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., Aarestrup F.M., Larsen M.V.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2640–2644.
20. *Joensen K.G., Scheut F., Lund O., Hasman H., Kaas R.S., Nielsen E.M., Aarestrup F.M.* Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1501–1510.
21. *Kaas R.S., Leekitcharoenphon P., Aarestrup F.M., Lund O.* Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One* 2014; 9: e104984.
22. *Otero L.H., Rojas-Altuve A., Llarull L.I., Carrasco-Lopez C., Kumarasiri M., Lastochkin E., Fishovitz J., Dawley M., Hesek D., Lee M. et al.* How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 16808–16813.
23. *Van Wart S.A., Ambrose P.G., Rubino C.M., Khariton T., Riccobene T.A., Friedland H.D., Crichtley I.A., Bhavnani S.M.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic target attainment analyses to evaluate *in vitro* susceptibility test interpretive criteria for ceftaroline against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 885–891.
24. *MacGowan A.P., Noel A.R., Tomaselli S., Bowker K.E.* Pharmacodynamics of ceftaroline against *Staphylococcus aureus* studied in an *in vitro* pharmacokinetic model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 2451–2456.

Цветкова Ирина Анатольевна — младший научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Сидоренко Сергей Владимирович — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западного государственного медицинского университета имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Флуоресцентный поляризационный иммуноанализ для экспрессного контроля содержания антибиотиков: разработка и характеристика на примере хлорамфеникола

С. А. ЕРЕМИН¹, О. Ю. ХАН¹, В. В. ПИСАРЕВ², Е. А. ЗВЕРЕВА³, А. В. ЖЕРДЕВ³, Б. Б. ДЗАНТИЕВ³

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

² Научно-производственный центр «Пробиотек», Москва

³ Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Fluorescence Polarization Immunoassay, for Express Control of Antibiotic Levels: Design and Characteristics for Chloramphenicol, as an Example

S. A. EREMIN¹, O. YU. KHAN¹, V. V. PISAREV², E. A. ZVEREVA³, A. V. ZHERDEV³, B. B. DZANTIEV³

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

² Scientific-Production Center «Probiotek», Moscow

³ A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» Russian Academy of Sciences, Moscow

Рассмотрены особенности флуоресцентного поляризационного иммуноанализа (ФПИИ) как средства экспрессного контроля наличия и содержания антибиотиков в различных видах проб, его преимущества по сравнению с другими аналитическими методами. На примере детекции антибиотика хлорамфеникола рассмотрены этапы разработки аналитической методики, определения её параметров. Анализ основан на конкурентном взаимодействии антител против хлорамфеникола с конъюгатом хлорамфеникол-флуорофор и потенциально содержащимся в тестируемой пробе свободным антибиотиком. Представлены экспериментальные результаты сравнения методик ФПИИ хлорамфеникола, реализованных с использованием двух конъюгатов, которые отличаются длиной мостикового участка между функциональными группами антибиотика и флуорофора (флуоресцеина). Охарактеризованы требования к выбору концентраций антител и конъюгата, обеспечивающих высокочувствительную детекцию. Предел обнаружения хлорамфеникола при использовании разработанного ФПИИ — 10 нг/мл, диапазон определяемых концентраций — от 20 нг/мл до 10 мкг/мл. Время определения — 10 мин.

Ключевые слова: хлорамфеникол, иммуноанализ, флуоресцентный поляризационный иммуноанализ.

Characteristics of the fluorescence polarization immunoassay (FPIA) as a mean for express control of antibiotic levels in various specimens and its advantages vs. other analytical tests are described. The developmental stages of the analytical procedure and its parameters are considered for chloramphenicol as an example. The analysis is based on competitive interaction of anti-chloramphenicol antibodies with the chloramphenicol-fluorophore conjugate and the potential free chloramphenicol in the specimen. The experimental results of the comparison of the chloramphenicol FPIA with the use of two conjugates differing in the length of the bridge length between the antibiotic functional groups and fluorophore (fluorescein) are presented. The requirements to the choice of the antibody and conjugate concentrations providing highly sensitive detection are characterized. The detection limit of chloramphenicol in the FPIA was 10 ng/ml and the determination of the concentrations ranged from 20 ng/ml to 10 mcg/ml. The time of the assay was 10 min.

Key words: chloramphenicol, immunoassay, fluorescence polarization immunoassay.

Введение

В настоящее время крайне востребованы высокочувствительные и производительные методы детекции антибиотиков. Это связано как с их медицинским применением (выбор индивидуальных терапевтических доз), так и с сопоставимым по объемам использованием в ветеринарии. Неконтролируемое применение антибиотиков в животноводстве для лечения и профилактики забо-

леваний приводит к загрязнению продуктов питания животного происхождения остаточными количествами соответствующих препаратов [1, 2] и их негативному воздействию на здоровье человека — возникновению аллергических реакций, развитию дисбактериозов и др. [3]. Важным последствием циркуляции антибиотиков в низких концентрациях в биосфере является распространение штаммов микроорганизмов, резистентных к действию лекарственных средств, что осложняет борьбу с инфекционными заболеваниями [4].

Для детекции антибиотиков реализуются преимущественно две группы подходов — хромато-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 119992 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, Химический факультет

графические и иммунохимические. Хроматографические методы позволяют проводить измерения с высокой точностью, но требуют специального дорогостоящего оборудования и сложной пробоподготовки [5–7]. В связи с этим для высокопроизводительного скрининга востребованы иммунохимические методы, сочетающие чувствительность и специфичность, но при этом реализуемые с использованием сравнительно простого приборного обеспечения, с минимальной пробоподготовкой и позволяющие одновременно характеризовать несколько десятков и даже сотен проб [8, 9]. Следует, однако, заметить, что доминирующие в настоящее время иммунохимические методы детекции антибиотиков — микропланшетный иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА) с использованием тест-полосок — имеют свои ограничения. В случае ИФА это существенное время, требуемое для получения результатов тестирования — 1–2 ч. Иммунохроматографические же тесты в традиционном исполнении предназначены лишь для качественного заключения о превышении определённой концентрации аналита в пробе и не позволяют проводить количественный анализ [10].

В этом отношении перспективны разработки иммуноаналитических методов, сочетающих экспрессность с возможностью количественного определения, но при этом не требующих сложного несерийного приборного обеспечения и трудоёмких аналитических процедур. Таким решением, показавшим эффективность при контроле разнообразных биологически активных соединений, является флуоресцентный поляризационный иммуноанализ (ФПИА). ФПИА относится к гомогенным методам анализа и основывается на явлении поляризации флуоресценции, которое обусловлено одновременным протеканием в растворе процессов поглощения и испускания света молекулами флуорофора и их вращением [11, 12]. При облучении реакционной среды плоскополяризованным возбуждающим светом степень поляризации флуоресценции зависит от того, находится ли флуорофор в свободном виде (высокая скорость вращения молекулы, низкая остаточная поляризация) или в комплексе с антителом (низкая скорость вращения крупного комплекса, высокая поляризация), что позволяет измерять концентрацию аналита в пробе. В качестве источника плоскополяризованного света и регистратора флуоресценции могут быть использованы различные серийно выпускаемые приборы, существующие как в стационарном, так и в переносном исполнении.

Достоинствами ФПИА являются: достаточно высокая чувствительность и специфичность, хорошая воспроизводимость, отсутствие трудоём-

кой пробоподготовки, экспрессность и производительность анализа. Следует также отметить простоту перехода от минимального количества необходимых исходных реагентов — стандарт антибиотика, флуорофор и специфические (поли- или моноклональные) антитела — к практической реализации аналитической методики, состоящей лишь в синтезе конъюгата флуорофор-антибиотик (трейсер) и последовательном выборе используемых концентраций реагентов.

В настоящей статье на примере иммунодетекции хлорамфеникола представлены все стадии такой разработки и характеристики аналитической методики. Экспрессный контроль содержания хлорамфеникола крайне востребован. Хотя обнаружение серьёзных побочных эффектов привело к законодательным ограничениям применения данного препарата и введению официальных требований к его максимально допустимым уровням в пищевой продукции [3, 13], хлорамфеникол вследствие широкого спектра антибактериальной активности и дешевизны продолжает активно использоваться в лечебных и профилактических целях.

Данная разработка продолжает цикл исследований, проводимых на Химическом факультете МГУ и направленных на создание комплекса тест-систем для мониторинга содержания антибиотиков, основанных на принципе ФПИА. Разработки методик ФПИА антибиотиков других классов представлены в ранее вышедших публикациях [14–18]. Дополнение этого ряда тест-систем данной разработкой обеспечивает возможность комплексного мониторинга антибиотиков основных классов.

Материал и методы

Химические реагенты. Для проведения синтезов и разработки методики были использованы химические реактивы отечественного (марки ос.ч. и х.ч.) и импортного («Sigma») производства. Овечьи поликлональные антитела против хлорамфеникола были любезно предоставлены проф. Р. Абукуеша (R. Abuknesha), Великобритания.

Исходный концентрированный раствор хлорамфеникола для хранения готовили в дистиллированной воде. Для проведения ФПИА растворы реагентов разбавляли 2,5 мМ боратым буфером, pH 8,0, содержащим 0,1% азида натрия.

Оборудование. Поляризацию флуоресценции регистрировали в кюветах с помощью поляризационного флуориметра «Beacon 2000» (Panvera, США). Длина волны возбуждения — 480 нм, эмиссии — 520 нм.

Получение конъюгатов хлорамфеникол-флуорофор. Использовали флуорофоры флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) и этилендиаминфлуоресцеинизотиоцианат (ЭДФ). Их конъюгацию с хлорамфениколом проводили в соответствии с [17]. Продолжительность взаимодействия — 2 ч при комнатной температуре. Для разделения продуктов реакции методом тонкослойной хроматографии применяли пластины «Silufol», Чехия; элюент — смесь метанола и хлороформа в объёмном соотношении 1:4.

Определение оптимального разведения трейсера. В 10 кюветах проводили последовательное двукратное разведение

трейсера в 0,1 мл боратного буфера, начиная с разведения 1:100. В кюветы добавляли по 0,4 мл того же буфера и затем измеряли интенсивность флуоресценции и её поляризацию.

Определение оптимального разведения антител. В 10 кюветах проводили последовательное двукратное разведение антител в 0,1 мл боратного буфера, начиная с разведения 1:20. В кюветы добавляли по 0,3 мл раствора трейсера в ранее выбранном разведении и по 0,1 мл буфера, после чего измеряли поляризацию флуоресценции.

Методика ФПИА: построение градуировочного графика и тестирование проб. В кюветы к 0,1 мл стандартного раствора хлорамфеникола (или тестируемой пробы) добавляли по 0,3 мл раствора трейсера и по 0,1 мл антител в ранее выбранных разведениях, затем измеряли поляризацию флуоресценции.

Однореагентный ФПИА проводили в соответствии с [19]. Для приготовления исходного реагента — комплекса трейсер-антитело — смешивали равные объёмы рабочих разведений трейсера и антител, разбавляли буфером в 5 раз и оставляли реагент на ночь в холодильнике, чтобы обеспечить достижение химического равновесия.

При проведении анализа в кюветы к 0,1 мл стандартного раствора хлорамфеникола (или тестируемой пробы) добавляли 0,4 мл однореагентного раствора, инкубировали при комнатной температуре 10 мин и измеряли поляризацию флуоресценции.

Обработка результатов измерений. Предел обнаружения анализа определяли согласно рекомендациям IUPAC по методу Родбарда [20]. Проводили 10 измерений стандарта с нулевой концентрацией антибиотика и рассчитывали среднее значение поляризации флуоресценции (mP_0), а также стандартное отклонение (S) этой величины. Значение поляризации флуоресценции, соответствующее пределу обнаружения, вычисляли по формуле $mP_{min} = mP_0 - 3S$, после чего по градуировочной кривой определяли концентрацию хлорамфеникола, обеспечивающую достижение данной величины mP_{min} .

При оценке воспроизводимости результатов измерений выбирались концентрации из линейной области градуировочного графика и для них по трём повторностям, выполненным в течение одного дня, рассчитывали стандартное квадратичное отклонение (SE) и коэффициенты вариации ($SE/X_{cp} \cdot 100\%$).

Результаты и обсуждение

Получение конъюгатов хлорамфеникол-флуорофор. Для конъюгата хлорамфеникол-ФИТЦ при очистке реакционной смеси были выделены три фракции с разными значениями R_f (0,1, 0,5, 0,6). Хлорамфеникол-ЭДФ был получен в виде одной полосы с $R_f = 0,7$.

Продукты синтеза растворяли в боратном буфере и хранили при $+4^\circ\text{C}$ (рис. 1).

Определение оптимальных разведений трейсеров и антител. В соответствии с практикой ФПИА [12] выбирали разведения трейсеров, для которых интенсивность флуоресценции при 520 нм в 10 раз

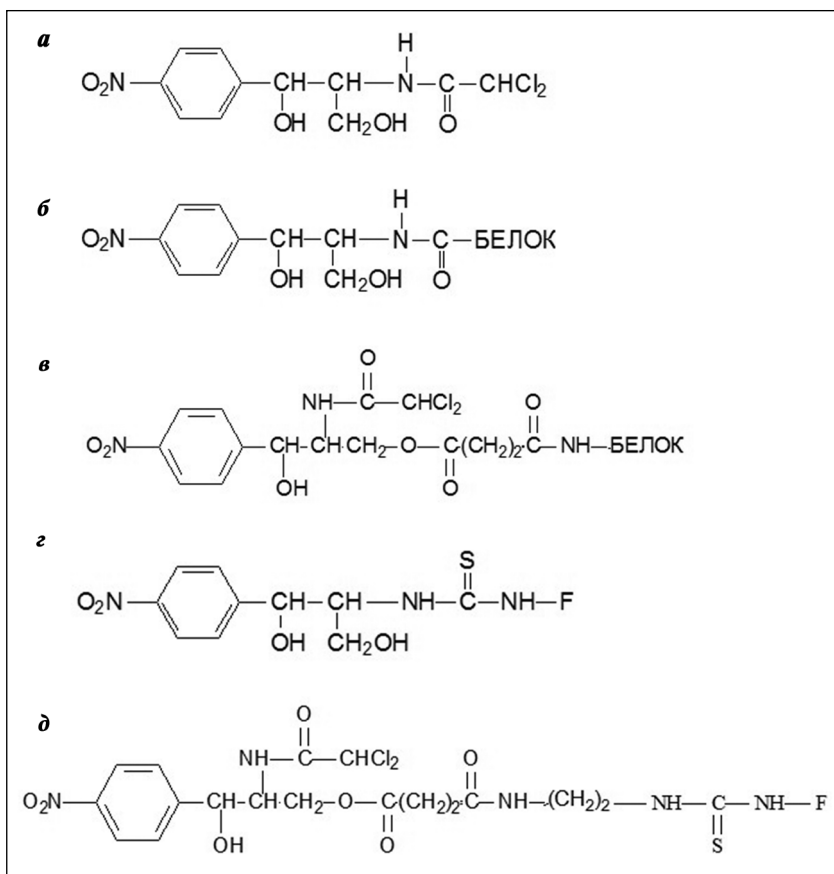


Рис. 1. Химические структуры.

а — хлорамфеникол; б, в — иммуногены для получения антител 1 и 2; г — трейсер 1 — хлорамфеникол-ФИТЦ; д — трейсер 2 — хлорамфеникол-ЭДФ.

превышала фоновое значение флуоресценции рабочего буферного раствора.

Были протестированы две антисыворотки на хлорамфеникол, полученные против иммуногенов, структурные формулы которых представлены на рис. 1 б, в. Получены зависимости степени поляризации флуоресценции от разведения антисывороток при фиксированных концентрациях взаимодействующих с ними трейсеров хлорамфеникол-ЭДФ и хлорамфеникол-ФИТЦ (рис. 2). Основным параметром связывания являлось разведение антисыворотки (титр), приводящее к 50% ингибированию поляризации флуоресценции.

Установлено, что для трейсера хлорамфеникол-ЭДФ отсутствует взаимодействие с антисыворотками. При использовании трейсера хлорамфеникол-ФИТЦ титры антисывороток 1 и 2 составили 1:100 и 1:250, соответственно.

Определение аналитических характеристик ФПИА. В оптимизированных условиях было реализовано конкурентное взаимодействие антисывороток со свободным хлорамфениколом (стандарт для градуировки или тестируемая проба) и хлорамфениколом, входящим в состав трейсера. Полученные градуировочные графики представлены на

рис. 3, а характеристики разработанной методики ФПИА хлорамфеникола — предел обнаружения и диапазон определяемых концентраций — в табл. 1.

Однореагентный ФПИА. Охарактеризована возможность детекции хлорамфеникола методом ФПИА с использованием однореагентного препарата — предварительно сформированного комплекса антитело-трейсер. Для определения кинетики диссоциации данного комплекса к нему добавляли свободный антиген (хлорамфеникол) в разных концентрациях, что приводило к вытеснению трейсера из иммунного комплекса (рис. 4). Установлено, что при этом вытеснении равновесие в системе достигается за 10–15 минут в зависимости от концентрации аналита. Подтвержденная экспрессность данного варианта ФПИА в сочетании с минимальной трудоемкостью тестирования обуславливают его конкурентный потенциал по сравнению с традиционным ФПИА.

Применение ФПИА для контроля хлорамфеникола в продуктах питания. Для подтверждения эффективности разработанной методики проведены эксперименты по внесению в пробы пищевой продукции (молока) известных количеств хлорамфеникола (метод «введено-найдено») (табл. 2). Показана высокая степень соответствия результатов определения хлорамфеникола методом ФПИА с данными о реальном его содержании в контаминированных пробах.

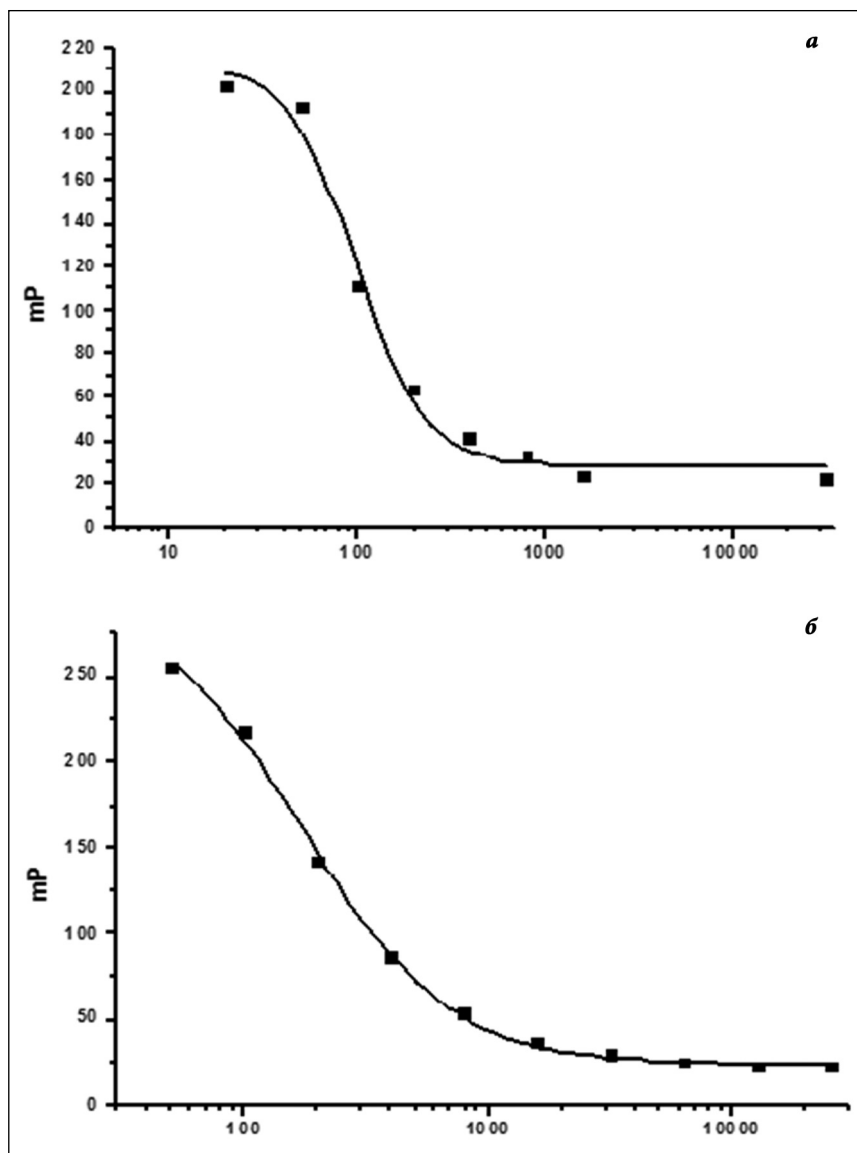


Рис. 2. Концентрационные зависимости связывания антисывороток с хлорамфениколом.

(а — антитела 1; б — антитела 2) с трейсером 1 (хлорамфеникол-ФИТЦ). По оси абсцисс — кратность разведения антисыворотки; по оси ординат — поляризация флуоресценции.

Таблица 1. Аналитические характеристики ФПИА хлорамфеникола

Антитела	Предел обнаружения, $C_{\min}$, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций (нг/мл)
Антитела 1	20	40—20 000
Антитела 2	10	20—10 000

Таблица 2. Полнота открытия хлорамфеникола в молоке

Концентрация, нг/мл	Процент открытия, %
10	101,4±3,0
50	92,4±4,0
150	87,3±4,0
300	87,6±2,0

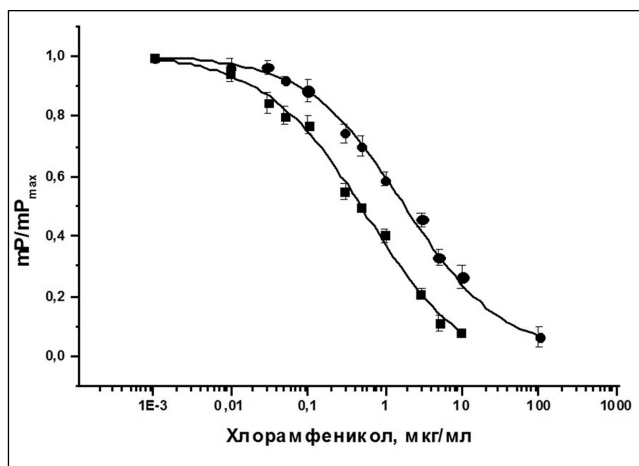


Рис. 3. Градуировочные графики ПФИА хлорамфеникола (● — антитела 1, ■ — антитела 2). По оси абсцисс — концентрация хлорамфеникола (мкг/мл) в пробе; по оси ординат — отношение поляризации флуоресценции тестируемой пробы и пробы без хлорамфеникола.

В результате проведенных исследований, разработана методика флуоресцентного поляризационного иммуноанализа антибиотика хлорамфеникола. Подобраны иммунореагенты и их концентрации, оптимальные для проведения анализа. Определены аналитические характеристики метода — предел обнаружения составил 10 нг/мл, диапазон определяемых концентраций — 20–10000 нг/мл. Продолжительность тестирования — 10 мин. Показана возможность использования разработанной методики при тестировании продуктов питания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blasco C., Torres C.M., Pico Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. *Trends Anal Chem* 2007; 26: 9: 895–913.
2. Durso L. M., Cook K. L. Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Cur Opin Microbiol* 2014; 19: 37–44.
3. Beyene T. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. *J Veterinar Sci Technol* 2016; 7: 1: 7.
4. Finley R.L., Collignon P., Larsson D.G.J., McEwen S.A., Li X.Z., Gaze W.H. *et al.* The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Diseases* 2013; 57: 5: 704–710.
5. Robert C., Gillard N., Brasseur P. Y., Pierret G., Ralet N., Dubois M., Delahaut P. Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A* 2013; 30: 3: 443–457.
6. Mottier P., Parisod V., Gremaud E., Guy P.A., Stadler R.H. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003; 994: 1–2: 75–84.
7. Barreto F., Ribeiro C., Hoff R. B., Costa T. D. Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with minimum sample preparation: validation according to 2002/657/EC Directive. *Food Addit Contam Part A* 2012; 29: 4: 550–558.
8. Tao X., Zhou S., Yuan X., Li H. Determination of chloramphenicol in milk by ten chemiluminescent immunoassays: influence of assay format applied. *Anal Methods* 2016; 8: 22: 4445–4451.
9. Xu F., Ren K., Yang Y., Guo J., Ma G., Liu Y. *et al.* Immunoassay of chemical contaminants in milk: A review. *J Integr Agric* 2015; 14: 11: 2282–2295.

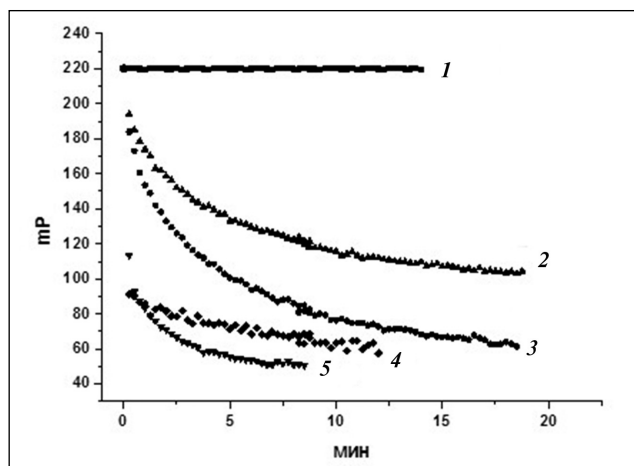


Рис. 4. Кинетические кривые вытеснения трейсера из иммунного комплекса при разных концентрациях хлорамфеникола. 1 — 0 мкг/мл; 2 — 1 мкг/мл; 3 — 10 мкг/мл; 4 — 100 мкг/мл; 5 — 1000 мкг/мл.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение о предоставлении субсидии от 11 ноября 2015 г. № 14.616.21.0061, уникальный идентификатор RFMEFI61615X0061).

10. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis. *Trends Anal Chem* 2014; 55: 81–93.
11. Smith D.S., Eremin S.A. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391: 1499–1507.
12. Еремин С.А. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ физиологически активных веществ. В кн.: Биохимические методы анализа. / Под ред. Б.Б. Дзантиева; М.: Наука; 2010. Стр. 368–389. / Eremin S.A. Poljarizacionnyy fluorescentnyy immunoanaliz fiziologicheskii aktivnykh veshchestv. V kn.: Biohimicheskie metody analiza. / Pod red. B.B. Dzantieva; M.: Nauka; 2010. Str. 368–389. [in Russian]
13. Gaudin V., Cadieu N., Maris P. Inter-laboratory studies for the evaluation of ELISA kits for the detection of chloramphenicol residues in milk and muscle. *Food Agric Immunol* 2003; 15: 143.
14. Murtazina N.R., Medjanceva Je.P., Pisarev V.V., Eremin S.A. Immunohimicheskoe opredelenie sul'fametazina v rechnoy vode i lekarstvennykh preparatah. *Himiko-farm zhurnal* 2005; 39: 8: 93–97. [in Russian]
15. Nesterenko I.S., Nokel' M.A., Eremin S.A. Immunohimicheskie metody opredeleniya sul'fanilamidnykh preparatov. *Zhurn analit him* 2009; 64: 5: 453–462. [in Russian]
16. Shanin I.A., Shajmardanov A.R., Nguen Ti Diu Thaj, Eremin S.A. Opredelenie antibiotika fluorhinolonovogo rjada levofloksacina v moche metodom poljarizacionnogo fluorescentnogo immunoanaliza. *Zhurn analit him* 2015; 6: 70: 617–623. [in Russian]
17. Gavrilov V.B., Eremin S.A., Egorov A.M. Spavnitel'nyy analiz immunohimicheskogo opredeleniya gentamicina po poljarizacii i tusheniju flouopescencii. *Antibiotiki i himioter* 1992; 37: 9: 36–39. [in Russian]

18. *Shanin I.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B.* Development of fluorescence polarization and enzyme-linked immunosorbent assays for danofloxacin detection in milk. *Int J Chem Sci* 2016; 14: 12: 283–298.
19. *Mi T., Wang Z., Eremin S., Shen J., Zhang S.* Simultaneous determination of multiple (fluoro)quinolone antibiotics in food samples by a one-step fluorescence polarization immunoassay. *J Agric Food Chem* 2013; 61: 39: 9347–9355.
20. *Rodbard D.* Statistical estimation of the minimal detectable concentration («sensitivity») for radioligand assays. *Anal Biochem* 1978; 90: 1: 1–12.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Еремин Сергей Александрович — д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва

Хан Олег Юрьевич — аспирант, кафедра химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва

Писарев Владимир Викторович — к.х.н., генеральный директор Научно-производственного центра Пробиотек, Москва

Зверева Елена Анатольевна — к.б.н., научный сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

Жердев Анатолий Виталиевич — к.б.н., ведущий научный сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

Дзантиев Борис Борисович — д.х.н., профессор, заместитель директора Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

Зависимая от концентрации антибиотика селекция линезолидоустойчивых стафилококков в динамической системе *in vitro*

К. Н. АЛИЕВА, Е. Н. СТРУКОВА, М. В. ГОЛИКОВА, Ю. А. ПОРТНОЙ, А. А. ФИРСОВ

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

Concentration-Dependent Enrichment of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* Dynamic Model

K. N. ALIEVA, E. N. STRUKOVA, M. V. GOLIKOVA, YU. A. PORTNOY, A. A. FIRSOV

Gause Research Institute of New Antibiotics, Moscow

С целью установления зависимости селекции резистентных мутантов *Staphylococcus aureus* от отношения площади под кривой «концентрация антибиотика — время» (AUC_{24}) к МПК исследовали фармакодинамику линезолида с помощью динамической системы *in vitro*. Моделировали режимы 5-дневного введения линезолида каждые 12 ч в 32-кратном диапазоне значений $AUC_{24}/МПК$. Воздействие антибиотика на смешанный инокулят чувствительных и устойчивых к линезолиду клеток 3 штаммов *S. aureus* изучали путём ежедневного посева на чашки Петри, содержащие антибиотик в концентрации 2×, 4× и 8×МПК, на протяжении 120 ч. При минимальных и максимальных значениях $AUC_{24}/МПК$ был отмечен слабый рост мутантов, устойчивых к линезолиду или его отсутствие, в то время как при промежуточных — интенсивная селекция резистентных клеток всех штаммов *S. aureus*. Показаны преимущества использования интегрального параметра $AUBC_M$ (площадь под кинетической кривой изменения численности резистентных мутантов) перед точечным параметром N_M (численность мутантов после многократного введения антибиотика) при установлении зависимости между $AUC_{24}/МПК$ и селекцией резистентных бактерий.

Ключевые слова: линезолид, резистентность *S. aureus*, динамическая система *in vitro*.

To establish the relationships between the enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* mutants and the ratio of daily area under the concentration — time curve (AUC_{24}) to the MIC of linezolid, a mixed inoculum of linezolid-susceptible and -resistant cells of three strains of *S. aureus* was exposed to twice daily linezolid in an *in vitro* dynamic model. Simulated pharmacokinetic profiles mimicked five-day treatments with linezolid dosing over a 32-fold range of the AUC_{24}/MIC ratio. Population analysis of linezolid-exposed staphylococci was performed daily over 120 h after the start of the treatments. Minor if any enrichment of mutants resistant to 2×, 4× and 8×MIC of antibiotic was observed at the lowest and the highest AUC_{24}/MIC ratios in contrast to pronounced enrichment of resistant mutants at the intermediate AUC_{24}/MIC s. An integral parameter $AUBC_M$, the area under the time course of resistance mutants, was shown to be a more appropriate endpoint to establish AUC_{24}/MIC relationships with resistance than postexposure number of mutants (N_M).

Key words: linezolid, *S. aureus* resistance, *in vitro* dynamic model.

Введение

Динамические системы, позволяющие изучать фармакодинамику антибиотиков при моделировании их фармакокинетических профилей *in vitro*, все шире применяются для прогнозирования процессов развития антибиотикорезистентности бактерий у человека. Такие исследования были проведены со фторхинолонами [1—12], ванкомицином [13] и даптомицином [13—14], для которых была установлена зависимость селекции резистентных

мутантов грамположительных [1—8, 13, 14] и грамотрицательных [4, 7, 9—12] бактерий от отношения суточной площади под кривой «концентрация антибиотика — время» (AUC_{24}) к МПК. В большинстве случаев снижение антибиотикочувствительности бактерий и/или повышение численности резистентных мутантов отмечалось при концентрации препаратов выше МПК, но ниже минимальной концентрации, предотвращающей селекцию мутантов (minimum prevention concentration — MPC) [15]. Это удалось объяснить с позиции теории «окна селекции мутантов» (mutant selection window — MSW) [16].

Попытки применить те же методические подходы для изучения процессов развития резис-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 119021, Большая Пироговская ул., д. 11, стр. 1. Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе

тентности к линезолиду штаммов *Staphylococcus aureus*, характеризующихся низкой частотой мутаций (10^{-9-11} [17–19]) оказались безуспешными, поскольку спонтанные мутанты с пониженной антибиотикочувствительностью не обнаруживались даже при большом исходном инокуляте (10^8 КОЕ/мл) [20]. Принципиальная возможность установления взаимосвязи между селекцией резистентных стафилококков и концентрацией линезолида была продемонстрирована в наших экспериментах с комбинированным инокулятом, который наряду с чувствительными клетками *S. aureus* содержал мутанты, полученные путём многократного пересева колоний на среды с антибиотиком [21]. Этот приём был использован при проведении настоящего исследования, целью которого явилось установление зависимости между селекцией линезолидоустойчивых мутантов *S. aureus* и отношением AUC_{24} в пределах от 0 до 24 ч (AUC_{24}) к МПК, варьируемого в широком диапазоне.

Материал и методы

Антибиотик, бактериальные штаммы и оценка их чувствительности. Линезолид был любезно предоставлен фирмой Pfizer, Inc. (США).

В работе были использованы 3 штамма *S. aureus*: коллекционный — *S. aureus* ATCC 700699, и клинические — *S. aureus* 479 и *S. aureus* 688. Значения МПК антибиотиков устанавливали методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона (МХБ), обогащённом ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} с использованием 24-часовых культур с исходной численностью клеток 5×10^5 КОЕ/мл [22]. Значения МПК линезолида составили 2 мкг/мл для каждого штамма.

Селекция резистентных мутантов и определение МРС. Селекцию мутантов, резистентных к линезолиду, проводили путём многократного пересева клеток на среде МХБ, содержащей линезолид в возрастающей концентрации (от 1 до 64 мкг/мл). После каждого пассажа 100 мкл среды с бактериями, выросшими в пробирке с максимальной концентрацией линезолида, переносили на чашки Петри с агаром Мюллера–Хинтона II (МХА), содержащим линезолид в той же концентрации [22]. Селекцию проводили с использованием 12 (*S. aureus* 479), 25 (*S. aureus* ATCC 700699) и 28 (*S. aureus* 688) пассажей. Резистентные мутанты каждого штамма *S. aureus* с 4-кратно возросшей МПК (8 мкг/мл) были отобраны для дальнейших исследований в динамической системе. Стабильность приобретённой резистентности была подтверждена для всех мутантов путём определения МПК после 20 пассажей на чашках Петри с МХА, не содержащем антибиотик.

Значения МРС в отсутствие и в присутствии резистентных мутантов определяли по описанной ранее методике [21]. За величину МРС принимали минимальную концентрацию линезолида, которая обеспечивала подавление роста мутантов первого порядка. Значения МРС линезолида для смешанного инокулята (10^{11} КОЕ/мл родительского штамма и 10^2 КОЕ/мл резистентных мутантов) и для инокулята, содержащего только чувствительные клетки, совпадали и составили 5, 6 и 10 мкг/мл для *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699, соответственно.

Моделируемые фармакокинетические профили. Во всех случаях моделировали моноэкспоненциальные фармакокинетические профили антибиотика со значением периода полувыведения, установленным при клиническом изучении фармакокинетики линезолида ($T_{1/2} = 6$ ч [23]). Линезолид вводили 2 раза в сутки с интервалом в 12 ч в течение 5 дней.

Моделируемые отношения $AUC_{24}/МПК$ составили 7,5; 15; 30; 60; 120 и 240 ч. Все эксперименты проводились в двух или более повторностях.

Динамическая система *in vitro*. Для изучения фармакодинамики линезолида использовали динамическую систему, описанную ранее [21]. Она представляет собой две камеры — одна со свежим МХБ (вспомогательная камера), другая с МХБ, содержащим бактериальную культуру с антибиотиком (основная камера). При помощи одного перистальтического насоса МХБ из вспомогательной камеры подаётся в основную камеру объёмом 100 мл; при помощи другого насоса содержимое основной камеры удаляется с той же объёмной скоростью (11,6 мл/ч).

Надёжность воспроизведения фармакокинетических профилей антибиотиков была подтверждена при помощи ВЭЖХ [20]. Фактическое значение периода полувыведения линезолида (в среднем 6,3 ч) было близко к заданному (6 ч).

Микробиологические исследования в динамической системе *in vitro*. Перед началом опыта динамическую систему заполняли свежим МХБ и термостатировали центральную камеру при 37°C. В центральную камеру вносили 18-часовую бактериальную культуру. После инкубации в течение 45 мин, когда концентрация клеток достигала примерно 10^8 КОЕ/мл (10^{10} КОЕ в 100 мл центральной камеры), в центральную камеру вносили 1 мл бактериальной суспензии с концентрацией клеток резистентных мутантов 10^2 КОЕ/мл. Итоговое соотношение чувствительных и резистентных к линезолиду клеток *S. aureus* составляло 10^8 КОЕ к 1 КОЕ [21].

На протяжении каждого эксперимента из центральной камеры отбирали пробы объёмом 100 мкл, которые последовательно разводили стерильной дистиллированной водой для предотвращения действия оставшегося в пробе антибиотика («antibiotic carry-over»). Затем пробы высевали на чашки Петри с МХА. Нижний предел определения численности клеток составлял 2×10^2 КОЕ/мл.

Популяционный анализ проводили путём посева проб каждые 24 ч на чашки с агаром МХА, содержащим линезолид в концентрации 2×, 4× или 8×МПК. При необходимости пробы разводили стерильной дистиллированной водой. Предел определения численности мутантных клеток — 10 КОЕ/мл.

Интенсивность роста резистентных мутантов характеризовали численностью клеток каждого уровня резистентности через 120 ч от начала введения антибиотика (N_M), а также интегральным параметром $AUBC_M$ (площадь под кинетической кривой изменения численности устойчивых к антибиотику мутантов в пределах от 0 до 120 ч за вычетом площади, равной их численности на уровне предела определения, умноженной на 120 ч) [3].

Результаты и обсуждение

При моделировании фармакокинетических профилей линезолида, отражающих изменения его концентрации при многократном введении, численность резистентных мутантов *S. aureus* 479, *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699 возрастала при значениях $AUC_{24}/МПК$ от 15 до 120 ч (табл. 1). Рост мутантов *S. aureus* 688, резистентных к 2× и 4×МПК линезолида, отмечен и при минимальном моделируемом значении $AUC_{24}/МПК$ (7,5 ч). Обогащение популяции устойчивыми мутантами начиналось через 24–48 ч после первого введения линезолида, достигая максимальной численности к 120 ч. Наиболее быстрая и интенсивная (вплоть до замещения чувствительной популяции мутантами различной степени резистентности) селекция резистентных клеток всех штаммов наблюда-

Таблица 1. Средние значения численности (в lg КОЕ/мл) мутантов штаммов *S.aureus*, резистентных к 2×МПК, 4×МПК и 8×МПК линезолида

Время, ч	AUC ₂₄ /МПК, ч																	
	7,5			15			30			60			120			240		
	2× МПК	4× МПК	8× МПК	2× МПК	4× МПК	8× МПК	2× МПК	4× МПК	8× МПК	2× МПК	4× МПК	8× МПК	2× МПК	4× МПК	8× МПК	2× МПК	4× МПК	8× МПК
<i>S.aureus</i> 479																		
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
24	1,0	1,0	1,0	1,4	1,0	1,0	2,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
48	1,0	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	5,1	1,5	1,0	4,3	1,0	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
72	1,5	1,0	1,0	3,1	1,0	1,0	7,1	3,9	1,0	6,4	2,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
96	1,0	1,0	1,0	3,5	1,0	1,0	8,5	5,9	2,6	7,5	3,9	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
120	1,0	1,0	1,0	3,8	1,0	1,0	8,6	7,4	2,7	8,0	4,9	2,2	2,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>S.aureus</i> 688																		
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
24	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,4	1,0	1,0	1,6	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
48	2,4	1,0	1,0	2,5	1,0	1,0	5,0	4,2	1,0	4,1	1,0	1,0	1,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
72	4,1	1,0	1,0	4,6	1,0	1,0	7,2	6,8	1,0	6,9	5,5	1,0	1,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
96	4,5	4,0	1,0	5,7	4,3	1,0	8,7	7,6	2,0	8,3	7,3	1,5	2,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
120	5,5	4,6	1,0	6,2	4,5	1,0	8,7	8,4	2,5	8,5	7,8	1,9	3,7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>S.aureus</i> ATCC 700699																		
0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
24	1,0	1,2	1,0	1,5	1,9	1,0	2,2	2,2	1,3	2,7	2,7	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
48	1,2	1,2	1,0	1,9	1,9	2,0	5,7	5,9	5,4	5,1	4,8	3,9	2,3	2,5	1,9	1,0	1,0	1,0
72	1,0	1,0	1,0	1,8	1,7	1,0	7,6	7,5	7,1	6,7	6,7	4,9	3,4	3,4	2,9	1,0	1,0	1,0
96	1,0	1,0	1,0	1,7	2,0	1,0	7,9	7,8	7,5	7,2	7,2	5,8	4,7	4,7	4,6	1,0	1,0	1,0
120	1,0	1,0	1,0	1,4	1,0	1,0	8,4	7,4	7,8	7,3	7,4	5,2	5,3	5,2	5,1	1,0	1,0	1,0

лась при значениях AUC₂₄/МПК, равных 30 и 60 ч, когда моделируемые профили линезолида находились внутри MSW на протяжении большей части интервала дозирования. При минимальных (7,5 ч) и максимальных (240 ч) значениях AUC₂₄/МПК отмечен слабый (умеренный в случае *S.aureus* 688 при AUC₂₄/МПК=7,5) рост мутантов или его отсутствие.

Популяционные данные характеризовали интегральным параметром AUBC_M, поскольку численность мутантов в конце эксперимента (параметр N_M), оцениваемая в большинстве подобных исследований, не всегда позволяет объективно отразить особенности кинетических кривых. Например, очевидные различия в динамике селекции мутантов *S.aureus* ATCC 700699 при разных значениях AUC₂₄/МПК (рис. 1), отражает параметр AUBC_M, но не N_M. Так, по мере повышения AUC₂₄/МПК с 60 до 120 ч величина AUBC_M снижалась на 40%, а величина N_M практически не менялась. Неадекватность оценки популяционных данных с помощью параметра N_M проявилась и при сравнении кинетических кривых, отражающих селекцию мутантов разного уровня резистентности. Несмотря на значительные различия в динамике селекции мутантов *S.aureus* 479 и *S.aureus* 688 (но не *S.aureus* ATCC 700699), резистентных к 2×МПК и 4×МПК (см. табл. 1), соответствующие значения N_M отличались меньше значений AUBC_M. Например, для *S.aureus* 479 различия в N_M для мутантов, резистентных к 2×МПК (N_{M, 2×МПК}) и 4×МПК (N_{M, 4×МПК}) были 1,6-кратными, а в AUBC_{M, 2×МПК}/AUBC_{M, 4×МПК} —

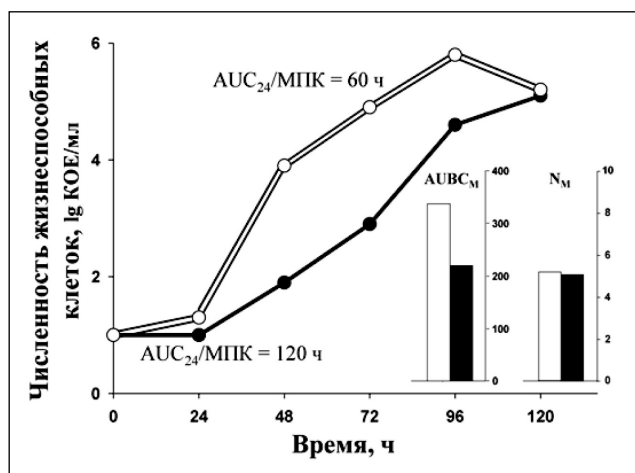


Рис. 1. Изменение численности мутантов *S.aureus* ATCC 700699, резистентных к 8×МПК линезолида.

В правом нижнем углу — соответствующие значения AUBC_M ((lg КОЕ/мл)×ч) и N_M (lg КОЕ/мл).

3,2-кратными (рис. 2). Полученные данные согласуются с результатами наших исследований с антибиотиками других групп, подтверждающими преимущества интегрального параметра перед точечным [3, 10, 12, 14, 21, 24—26].

Средние значения AUBC_M для каждого штамма *S.aureus* при каждом из моделируемых значений AUC₂₄/МПК приведены в табл. 2. Во всех случаях максимальные значения AUBC_M были отмечены при AUC₂₄/МПК=30 ч, независимо от уровня резистентности, причём значения

Таблица 2. Средние значения AUC_{24} для штаммов *S. aureus*

Штамм <i>S. aureus</i>	Уровень резистентности мутантов	AUC_{24}/MPK , ч					
		7,5	15	30	60	120	240
479	2×МПК	12	175	542	448	64	0
	4×МПК	0	0	277	138	0	0
	8×МПК	0	0	58	14	0	0
688	2×МПК	248	295	554	493	119	0
	4×МПК	115	121	463	341	0	0
	8×МПК	0	0	42	22	0	0
ATCC 700699	2×МПК	5	72	545	497	227	0
	4×МПК	7	82	539	491	232	0
	8×МПК	0	24	494	336	200	0

AUC_{24} , установленные для более резистентных мутантов, были ниже, чем для менее резистентных. Как следует из таблицы, при более низких (7,5–15 ч) и более высоких (120–240 ч) отношениях AUC_{24}/MPK значения AUC_{24} были ниже установленных при промежуточных значениях AUC_{24}/MPK (30–60 ч). Ранее подобные закономерности, согласующиеся с концепцией MSW [16], были описаны только для фторхинолонов [1–12], ванкомицина [13] и даптомицина [13, 14].

Знание зависимости AUC_{24} от AUC_{24}/MPK позволяет прогнозировать значения AUC_{24}/MPK , обеспечивающие предотвращение селекции резистентных стафилококков и/или подавление их пролиферации при клиническом применении линезолида. Как следует из табл. 2, эти значения составляют около 120 ч (терапевтическая величина) для *S. aureus* 479 и 240 ч для *S. aureus* 688 и *S. aureus* ATCC 700699). Поскольку такой прогноз носит консервативный характер — в экспериментах *in vitro* не учитывается вклад иммунологического фактора в противобактериальное действие антибиотика, — можно полагать, что селекция линезолидорезистентных стафилококков в клинике маловероятна.

Заключение

В настоящем исследовании были изучены закономерности селекции устойчивых к линезолиду мутантов *S. aureus* в зависимости от его концентрации при моделировании фармакокинетики антибиотика в динамических системах *in vitro*. При минимальных и максимальных значениях AUC_{24}/MPK обогащение популяции резистентными мутантами было выражено слабее, чем при промежуточных значениях

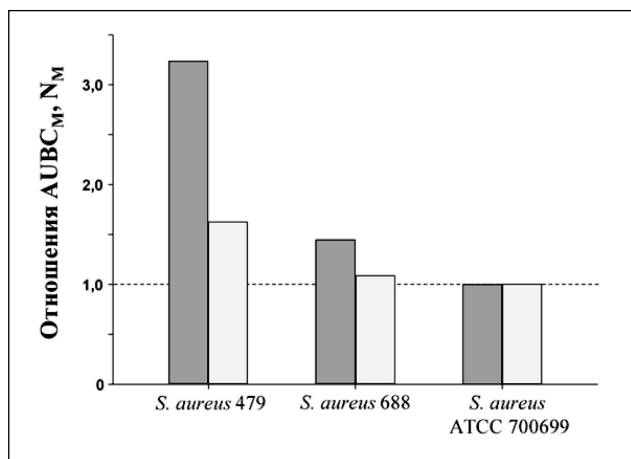


Рис. 2. Отношения $AUC_{24,2 \times MPK}/AUC_{24,4 \times MPK}$ (■) и $N_{M,2 \times MPK}/N_{M,4 \times MPK}$ (□) при $AUC_{24}/MPK = 60$ ч.

AUC_{24}/MPK . Установлена зависимость AUC_{24} от AUC_{24}/MPK , позволяющая прогнозировать значения AUC_{24}/MPK , обеспечивающие предотвращение селекции резистентных стафилококков и/или подавление их пролиферации при клиническом применении линезолида. Популяционные данные характеризовали интегральным параметром AUC_{24} , поскольку численность мутантов в конце эксперимента (N_M) не позволяет объективно отразить динамику обогащения популяции резистентными клетками.

Источник финансирования: Исследование проведено благодаря финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ, соглашение №14-15-00970).

ЛИТЕРАТУРА

1. Firsov A.A., Vostrov S.N., Lubenko I.Y., Drlica K., Portnoy Y.A., Zinner S.H. *In vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1604–1613.
2. Firsov A.A., Vostrov S.N., Lubenko I.Y., Arzamastsev A.P., Portnoy Y.A., Zinner S.H. ABT492 and levofloxacin: comparison of their pharmacodynamics and their abilities to prevent selection of resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* dynamic model. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 178–186.
3. Firsov A.A., Smirnova M.V., Strukova E.N., Vostrov S.N., Portnoy Y.A., Zinner S.H. Enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion. Int J Antimicrob Agents 2008; 32: 488–493.
4. MacGowan A.P., Rogers C.A., Holt H.A., Bowker K.E. Activities of moxifloxacin against, and emergence of resistance in, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* pharmacokinetic model. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1088–1095.
5. Zinner S.H., Lubenko I.Y., Gilbert D., Simmons K., Zhao X., Drlica K. et al. Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* dynamic model that simulates moxifloxacin concentrations inside and outside the

- mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency and bacterial killing. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 616–622.
6. Oonishi Y., Mitsuyama O., Yamaguchi K. Effect of GrlA mutation on the development quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacokinetic model. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1030–1037.
 7. Tam V.H., Louie A., Deziel M.R., Liu W., Leary R., Drusano G.L. The relationship between quinolone exposures and resistance amplification is characterized by an inverted U: a new paradigm for optimizing pharmacodynamics to counterselect resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 744–747.
 8. Liang B., Bai N., Cai Y., Wang R., Drlica K., Zhao X. Mutant prevention concentration-based pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as dosing targets for suppressing the enrichment of levofloxacin-resistant subpopulations of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2409–24012.
 9. Gebru E., Choi M.-J., Lee S.-J., Damte D., Park S.C. Mutant-prevention concentration and mechanism of resistance in clinical isolates and enrofloxacin/ marbofloxacin-selected mutants of *Escherichia coli* of canine origin. *J Med Microbiol* 2011; 60: 1512–1522.
 10. Firsov A.A., Strukova E.N., Shlykova D.S., Portnoy Y.A., Kozyreva V.K., Edelstein M.V. et al. Bacterial resistance studies using *in vitro* dynamic models: the predictive power of the mutant prevention and minimum inhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 4956–4962.
 11. Firsov A.A., Portnoy Y.A., Strukova E.N., Shlykova D.S., Zinner S.H. Predicting bacterial resistance using the time inside the mutant selection window: possibilities and limitations. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44: 301–305.
 12. Firsov A.A., Strukova E.N., Portnoy Y.A., Shlykova D.S., Zinner S.H. Bacterial antibiotic resistance studies using *in vitro* dynamic models: population analysis vs. susceptibility testing as endpoints of mutant enrichment. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46: 313–318.
 13. Firsov A.A., Smirnova M.V., Lubenko I.Y., Vostrov S.N., Portnoy Y.A., Zinner S.H. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin and vancomycin in an *in vitro* dynamic model. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 1185–1192.
 14. Smirnova M.V., Vostrov S.N., Strukova E.N., Dovzhenko S.A., Kobrin M.B., Portnoy Y.A. et al. The impact of duration of antibiotic exposure on bacterial resistance predictions using *in vitro* dynamic models. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 815–820.
 15. Blondeau J.M., Zhao X., Hansen G., Drlica K. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 433–438.
 16. Blondeau J.M., Hansen G., Metzger K., Hedlin P. The role of PK/PD parameters to avoid selection and increase of resistance: mutant prevention concentration. *J Chemother* 2004; 16: 1–19.
 17. Miller K., Dunsmore C.J., Fishwick C.W., Chopra I. Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1737–1742.
 18. Clark C., Kosowska-Shick K., McGhee P., Dewasse B., Beachel L., Appelbaum P.C. Resistance selection studies comparing the activity of razupenem (PTZ601) to vancomycin and linezolid against eight methicillin-resistant and two methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3118–3121.
 19. Locke J.B., Hilgers M., Shaw K.J. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5265–5274.
 20. Smirnova M.V., Strukova E.N., Portnoy Y.A., Dovzhenko S.A., Kobrin M.B., Zinner S.H. et al. The antistaphylococcal pharmacodynamics of linezolid alone and in combination with doxycycline in an *in vitro* dynamic model. *J Chemother* 2011; 23: 140–144.
 21. Firsov A.A., Golikova M.V., Strukova E.N., Portnoy Y.A., Romanov A.V., Edelstein M.V. et al. *In vitro* resistance studies with bacteria that exhibit low mutation frequencies: prediction of «antimutant» linezolid concentrations using a mixed inoculum containing both susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 1014–1019.
 22. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. Eighth Edition. CLSI document M-07-08, Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
 23. Moellering R.C. Jr. A novel antimicrobial agent joins the battle against resistant bacteria. *Ann Intern Med* 1999; 130: 155–1557.
 24. Firsov A.A., Shevchenko A.A., Vostrov S.N., Zinner S.H. Inter- and intra-quinolone predictors of antimicrobial effect in an *in vitro* dynamic model: new insight into a widely used concept. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 659–665.
 25. Голикова М.В., Струкова Е.Н., Портной Ю.А., Фирсов А.А. Прогнозирование антибиотикорезистентности бактерий методами фармакокинетико-фармакодинамического моделирования: альтернативные подходы к анализу экспериментальных данных. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2015; 60: 12–16. / Golikova M.V., Strukova E.N., Portnoj Ju.A., Firsov A.A. Prognozirovanie antibiotikorezistentnosti bakterij metodami farmakokinetiko-farmakodinamicheskogo modelirovaniya: al'ternativnye podhody k analizu jeksperimental'nyh dannyh. *Klin mikrobiol antimikrob himioter* 2015; 60: 12–16. [in Russian]
 26. Strukova E.N., Portnoy Y.A., Zinner S.H., Firsov A.A. Predictors of bacterial resistance using *in vitro* dynamic models: area under the concentration-time curve related to either the minimum inhibitory or mutant prevention antibiotic concentration. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 678–684.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Фирсов Александр Алексеевич — чл.-корр. РАН, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией, директор института, лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва. e-mail: kindyn@gmail.com

Алиева Камилла Натиевна — аспирант, лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва. e-mail: Qvinqwem@yandex.ru

Струкова Елена Николаевна — к.б.н., с.н.с., лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва. e-mail: lena-stru@inbox.ru

Голикова Мария Владимировна — к.б.н., с.н.с., лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва. e-mail: smirnovka2007@yandex.ru

Портной Юрий Абрамович — с.н.с., лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва. e-mail: yuportnoy@gmail.com

Динамика клинической картины острого обструктивного бронхита у детей на фоне противовирусной терапии

Е. Г. КОНДЮРИНА¹, И. О. ТЮЛЕНЕВА², Е. И. БУРЦЕВА³, С. В. ТРУШАКОВА³, Е. А. МУКАШЕВА³,
А. А. ВИНОГРАДОВА¹, Т. Н. ЕЛКИНА¹, В. В. ЗЕЛЕНСКАЯ¹

¹ Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Новосибирск

² Коченевская Центральная районная больница, пос. Коченево, Новосибирская обл.

³ Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва

Evaluating Changes in The Clinical Presentation of Acute Obstructive Bronchitis in Preschool Children Using Antiviral Therapy

E. G. KONDYURINA¹, I. O. TYULENEVA², E. I. BURTSEVA³, S. V. TRUSHAKOVA³, E. A. MUKASHEVA³,
A. A. VINOGRADOVA¹, T. N. ELKINA¹, V. V. ZELENSKAYA¹

¹ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

² District Central Hospital of Kochenevo, Novosibirsky Region

³ D.I. Ivanovsky Virology Institute, N. F. Gamaleya Federal Research Center for Microbiology and Epidemiology, Moscow

Цель. Оценка динамики клинической картины острого обструктивного бронхита у дошкольников при использовании противовирусной и противовоспалительной терапии в проведенном рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании, включавшем 54 ребенка (3–6 лет), госпитализированных с установленным диагнозом острого обструктивного бронхита (ООБ). В 1-й группе (26 человек) этиотропная терапия проводилась препаратом с комплексным противовирусным, противовоспалительным и антигистаминным действием (Эргоферон), во 2-й (28 детей) — применялось плацебо, при этом все дети получали комплексную терапию ООБ. Сравнивали сроки купирования клинических проявлений заболевания, степень уменьшения выраженности ведущих синдромов и частоту эпизодов усиления бронхиальной обструкции и развития осложнений. **Результаты.** По данным ПЦР в обеих группах в мазках из ротоносоглотки доминировали риновирусы (31% случаев — в 1-й и 57% — во 2-й группах), кроме этого определялись РНК вируса гриппа В, респираторно-синцитиального вируса, вирусов парагриппа 2-го и 4-го типов и метапневмовируса, у трёх детей в каждой группе определялась РНК нескольких разных вирусов одновременно; различий между группами не было обнаружено. В 1-й группе средняя продолжительность повышенной температуры (утренние измерения) составила 1,6 (1,4–1,9)±0,6 сут; нормальные значения утренней и вечерней температуры всеми детьми были достигнуты к окончанию третьих суток терапии. Во 2-й группе утренняя температура тела достигала нормальных значений в среднем на 2,7 (2,1–3,3)±1,2 сут, *U*-критерий, *p*=0,002), а полная её нормализация у всех детей отмечалась на 6-е сутки наблюдения. Площадь под кривой для показателя суточной температуры тела была статистически значимо меньше в 1-й группе: 514,3 (513,8–514,9)±1,4 (°C×дни) против 516,3 (515,1–517,5)±2,5 (°C×дни) во 2-й группе (*U*-критерий, *p*=0,002). Интоксикация в среднем купировалась в 1-й группе через 2,8 (2,5–3,1)±0,80 дня, а во 2-й группе — через 4,5 (4,1–4,8)±0,96 дня (*p*<0,001). Выраженность катаральных симптомов (затруднение носового дыхания, насморк, кашель) быстрее уменьшалась у детей 1-й группы (*p*<0,05). Для катарального синдрома средние сроки купирования составили 6,0 (5,7–6,3)±0,8 суток против 9,0 суток для 1-й и 2-й групп (*p*<0,001) соответственно. Бронхообструктивный синдром (БОС) в среднем купировался через 4,1 (4,0–4,2)±0,3 сут в 1-й группе и через 6,9 (6,7–7,0)±0,4 сут во 2-й группе (*p*<0,001). У 8 детей из 2-й группы, несмотря на проводимое лечение, в первые 3–4 дня терапии отмечалось умеренное усиление выраженности БОС, а у трёх из них — подъём температуры до субфебрильного уровня, что потребовало проведения антибактериальной терапии. В 1-й группе ни у одного ребенка не было зарегистрировано развитие бактериальных осложнений и нарастание БОС. Все дети из 1-й группы полностью выздоровели на 8-е сутки. Во 2-й группе полного выздоровления не было зарегистрировано ни у одного пациента на 9-е сутки. Средний срок выздоровления в 1-й группе составил 6,0 (5,7–6,3)±0,8 дня против 9,0 дней во 2-й группе (*p*<0,001). В ходе проведения исследования не было зарегистрировано каких-либо побочных эффектов, связанных с приёмом препаратов. Среднее значение оценки эффективности терапии, данной врачом-исследователем по шкале CGI, в 1-й группе составило 3,7 (3,5–3,8)±0,49 балла против 2,6 (2,3–2,9)±0,69 баллов во 2-й группе (*p*<0,005). Аналогичной была оценка эффективности лечения БОС: 3,7 (3,4–3,9)±0,57 баллов и 2,2 (1,7–2,7)±1,29 балла для 1-й и 2-й групп соответственно. Безопасность препаратов по шкале CGI была максимальной в обеих группах. Родительская оценка переносимости терапии в 1-й группе была на 50% выше, чем во 2-й: 3,6 (3,4–3,8)±0,57 балла и 2,5 (1,8–2,9)±1,31 балла (*p*<0,005). **Заключение.** Применение противовирусного и противовоспалительного препарата Эргоферона в комплексной терапии острого обструктивного бронхита у дошкольников позволяет добиться быстрой положительной динамики клинической картины, в том числе купировать проявления бронхиальной обструкции, предотвращает развитие бактериальных осложнений и усиление БОС, хорошо переносится пациентами.

Ключевые слова: острые респираторные инфекции, острый обструктивный бронхит, противовирусная терапия, противовоспалительная антигистаминная терапия, Эргоферон, дети, ПЦР, рандомизированные двойные слепые плацебо-контролируемые клинические исследования.

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 630000 Новосибирск, Красный проспект, 52

A randomized double-blind controlled study was carried out to evaluate changes in the clinical presentation of acute obstructive bronchitis in preschool children using antiviral, anti-inflammatory therapy. The study enrolled 54 subjects (aged 3–6 years old) hospitalized with verified diagnosis of acute obstructive bronchitis. Their parents had given their informed consent for participation. Group 1 ($n=26$) received etiotropic therapy with the drug having complex antiviral, anti-inflammatory and antihistamine effect (Ergoferon), group 2 ($n=28$) received placebo. Meanwhile all children received complex therapy of ARI. To evaluate therapeutic efficacy the following parameters were compared: time to elimination of the clinical manifestations of the disease; extent of alleviation of the key symptoms, incidence of wheezing episodes and complications. Results. According to PCR, rhinoviruses prevailed in both groups in oropharyngeal swabs (31% in group 1 and 57% in group 2); furthermore, RNA of influenza B virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus types 2 and 4 and metapneumovirus were also detected; 3 children in each group simultaneously had RNA of various viruses; no differences between the groups were observed. In group 1 average duration of increased body temperature (morning measurement) was 1.6 (1.4–1.9)±0.6 days, respectively, and all children reached normal values of morning and evening body temperature by the end of 3-day therapy. In group 2 morning body temperature reached normal values on types 2.7 (2.1–3.3)±1.2 days, respectively (U -test, $P=0.002$), while complete normalization in all children took place on day 6 of the follow-up. Area under curve for daily body temperature was statistically lower in group 1: 514.3 (513.8–514.9)±1.4 (°C × days) vs. 516.3 (515.1–517.5)±2.5 (°C × days) in group 2 (U -test, $P=0.002$). Intoxication in group 1 was eliminated within 2.8 (2.5–3.1)±0.80 days on average, in group 2 — within 4.5 (4.1–4.8)±0.96 days ($P<0.001$). Intensity of catarrhal symptoms (nasal congestion, rhinitis, cough) resolved faster in group 1 ($P<0.05$). Average elimination term for catarrhal symptoms was 6.0 (5.7–6.3)±0.8 days vs. 9.0 days for groups 1 and 2 ($P<0.001$), respectively. Wheezing resolved within 4.1 (4.0–4.2)±0.3 days on average in group 1 and within 6.9 (6.7–7.0)±0.4 days in group 2 ($P<0.001$). Despite the treatment, eight children in group 2 showed moderate reinforcement of wheezing within the first 3–4 days of therapy, 3 of them had body temperature increased to subfebrile values requiring antibacterial treatment. Neither of children in group 1 had any bacterial complications or reinforced wheezing. All children from group 1 had complete recovery on day 8. Neither of subjects recovered completely on day 9 in group 2. Average recovery term in group 1 was 6.0 (5.7–6.3)±0.8 days vs. 9.0 days in group 2 ($P<0.001$). No adverse effects associated with the medicinal products were recorded during the study. Average rating of therapeutic efficacy by the investigator using CGI scale was 3.7 (3.5–3.8)±0.49 scores in group 1 vs. 2.6 (2.3–2.9)±0.69 scores in group 2 ($P<0.005$). Rating of wheezing therapy efficacy was similar: 3.7 (3.4–3.9)±0.57 and 2.2 (1.7–2.7)±1.29 for groups 1 and 2, respectively. Safety of the products according to CGI scale reached maximum in both groups. Parents' rating of the treatment in group 1 was 50% higher as compared to group 2: 3.6 (3.4–3.8)±0.57 scores and 2.5 (1.8–2.9)±1.31 scores ($P<0.005$). **Conclusion.** Ergoferon in complex therapy of acute obstructive bronchitis in preschool children ensures rapid therapeutic effect including elimination of wheezing symptoms, prevention of bacterial complications, wheezing progression and is well tolerated by the subjects.

Key words: acute respiratory infections, acute obstructive bronchitis, wheezing, antiviral therapy, anti-inflammatory antihistamine therapy, Ergoferon, preschool children, PCR, randomised double blind placebo-controlled clinical trials.

Введение

Острые респираторные инфекции (ОРИ) являются самыми частыми инфекционными заболеваниями. По данным Роспотребнадзора, в период с января по октябрь 2016 года заболеваемость ОРИ на 100 тыс человек среди детей в возрасте до 14 лет в 11,8 раз превысила аналогичный показатель среди взрослого населения, разница в заболеваемости гриппом составила 2,6 раза [1]. В 2015 году различия были еще более значительными — 12,2 и 4,2 раза, соответственно [2].

В основном острые респираторные заболевания вызываются вирусами из 4–5 групп (риновирусы, вирусы парагриппа, респираторно-синцитиальные вирусы, аденовирусы, коронавирусы) и внутриклеточными возбудителями (хламидофилы и микоплазмы). Даже в периоды эпидемий доля гриппа в структуре ОРИ не превышает 20–30%, в обычные же сезоны она не поднимается выше 5%. При различной этиологии ОРИ формируется симптомокомплекс в соответствии с тропностью вируса к органам и отделам респираторного тракта. Наиболее часто при ОРИ отмечаются катаральный синдром (затруднённое носовое дыхание, выделения из носовых ходов, боли и першение в горле, кашель и др.) и синдром интоксикации (лихорадка разной выра-

женности, слабость, головная боль, миалгии и др.), заболевание ограничивается только верхними отделами дыхательных путей. Но почти у каждого четвертого ребёнка инфекция «спускается» в нижние отделы респираторного тракта с появлением клиники острого бронхита, в том числе с бронхиальной обструкцией разной степени выраженности: удлиненный выдох, сопровождающийся в слышимыми на расстоянии от ребенка экспираторными шумами, хрипами (wheezing); участие в акте дыхания вспомогательной мускулатуры с втяжением уступчивых мест грудной клетки; кашель, чаще всего имеющий непродуктивный или малопродуктивный характер; характерные дыхательные шумы, определяемые аускультативно. Развитие бронхообструктивного синдрома (БОС) более характерно для детей младшего возраста [3].

Этиологически БОС чаще ассоциирован с РНК-содержащими вирусами [4]. У детей в возрасте до двух лет преобладает респираторно-синцитиально вирусная инфекция (РСВ), являющаяся самой частой причиной острого бронхита. В более старшем возрасте на первое место по частоте выходит БОС, ассоциированный с риновирусами. Это самая многочисленная группа вирусов: выделено более 150 их видов, особенно тяжёлые

проявления связаны с типом С [5]. В последнее время появлялись указания на значимую роль «новых» респираторных вирусов, в том числе бокавирусов и метапневмовирусов [6]. Особую проблему представляет множественное сочетанное выделение вирусов из ротоносоглотки в период ОРИ, которое фиксируется у каждого третьего ребёнка.

Возбудители ОРИ вызывают повреждение, вплоть до цитолиза, респираторного эпителия, что сопровождается развитием воспалительных реакций (усилением и нарушением кровотока, повышением проницаемости сосудов, инфильтрацией различными клетками и накоплением медиаторов воспаления). Это усиливает продукцию слизи, вязкость которой значительно повышается, изменяется тонус не только сосудов, но и дыхательных путей. Воздействуя на сигнальные пути ряда молекул и рецепторов, принимающих участия в ранних и отсроченных фазах иммунного ответа, респираторные вирусы подавляют интерферогенез, функцию естественных киллеров и т.д. [7–10].

В последние годы показано, что вирусывыделение у детей при ОРИ продолжается дольше, чем у взрослых. Вирусная нагрузка напрямую связана с длительностью респираторных симптомов и госпитализации, поражением нижних отделов респираторного тракта. Скорость элиминации вирусов особенно замедлена у детей с atopическими заболеваниями, она коррелирует с длительностью и тяжестью обострений аллергической патологии [11–13]. Одновременно показано, что поражение нижних отделов респираторного тракта характерно при вирусной инфекции для пациентов со сниженной продукцией разных классов интерферонов, эпителиальной дезинтеграцией, atopическими заболеваниями [14]. Поэтому терапия острых обструктивных бронхитов должна учитывать не только необходимость подавления возбудителя респираторной инфекции, контроль над симптомами заболевания, но и содержать препараты, обладающие противовоспалительным действием и восстанавливающими интерферонпродукцию, что может лежать в основе полипрагмазии [15].

В последние годы, наряду с исследованиями новых противогриппозных противовирусных препаратов [16, 17], значительное внимание уделяется применению интерферонов и их индукторов для лечения ОРИ вирусной этиологии [18].

В России с 2011 года известен и широко применяется для лечения ОРИ, в том числе гриппа у детей и взрослых, релиз-активный противовирусный

препарат с противовоспалительным и антигистаминным действием — Эргоферон [19–21]. В условиях экспериментов и в клинических исследованиях была показана терапевтическая эффективность Эргоферона в лечении широкого спектра ОРИ, вызванных вирусами гриппа А и В, парагриппа, риновирусами, РС-вирусами, аденовирусами [22–25], в том числе на фоне бронхиальной астмы [26, 27].

Учитывая роль вирусной инфекции в генезе воспаления, воздействие возбудителей на механизмы защиты макроорганизма, сопряжённость степени вирусной нагрузки с поражением нижних отделов респираторного тракта и тяжестью обструкции дыхательных путей, применение противовирусного препарата с комплексным действием представляется перспективным в контроле симптомов обструкции дыхательных путей, для чего было проведено проспективное контролируемое рандомизированное с двойным ослеплением и плацебо-контролем исследование динамики клинических симптомов острого обструктивного бронхита на фоне противовирусной терапии Эргофероном у дошкольников.

Материал и методы

Исследование проводилось во время весеннего и осеннего подъёма заболеваемости ОРИ в 2015 г. на базе детского отделения центральной районной больницы г. Коченево (Новосибирская область) у детей в возрасте от 3 до 6 лет, госпитализированных в стационар с установленным диагнозом острого обструктивного бронхита, чьи родители выразили информированное согласие на участие. Критериями включения были: клиника острого обструктивного бронхита (кашель, пролонгированный выдох, втяжение податливых мест грудной клетки, участие вспомогательной мускулатуры в акте дыхания, эмфизема, сухие свистящие хрипы) как проявление ОРИ средней тяжести; возраст 3–6 лет, повышение температуры до фебрильной или субфебрильной в анамнезе данного заболевания¹ и катаральные симптомы со стороны верхних дыхательных путей (выделения из носа, затруднение носового дыхания, боль в горле и др.).

Пациенты с установленным ранее диагнозом «бронхиальная астма», с признаками бактериальной инфекции на момент поступления в стационар не включались в исследование. Критериями невключения являлись: указание на аллергию/непереносимость любого из компонентов лекарственных препаратов, используемых в лечении и наличие тяжёлых хронических заболеваний, влияющих на возможность пациента участвовать в клиническом исследовании и на течение заболевания (судорожный синдром, ВИЧ-инфекция, туберкулёз любой локализации, сахарный диабет, онкология, пороки развития, хроническая недостаточность функции почек, печени, сердечно-сосудистой системы и др.).

Участники распределялись в группы с применением метода блоковой рандомизации, все получали комплексную терапию ОРИ. Применение противовирусных (за исключением Эргоферона) и иммуномодулирующих медикаментов, занесённых в список запрещённых препаратов², было исключено.

¹ Наличие повышенной температуры тела на момент включения в исследование не являлось обязательным условием.

² Противовирусные и (или) иммуномодулирующие препараты: римантадин, осельтамивир, занамивир, ингавирин, инозин пранобекс (изопринозин, гроприносин), анаферон, анаферон детский, дезоксирибонуклеат натрия, в том числе в комплексе с железом (деринат, ферровир), гагоцел, тилорон (амиксин, лавомакс и др.), амизон, циклоферон, неовир, панапавир, интерферон альфа (-2а, -2в), интерферон гамма, производные Эхинацеи (иммунал, иммунонорм и др.), имунорикс, лизаты бактерий или их органелл (ИРС-19, рибомунил и др.), гомеопатические «противогриппозные» и «противопростудные» препараты (оциллококцинум, афлубин, инфлюцид и др.), цитовир-3, полиоксидоний, липоксид и др.

Таблица 1. Основные характеристики сравниваемых групп

Показатели	Группы	
	1-я	2-я
Число пациентов, <i>n</i>	26	28
Половой состав: муж., %	54	50
Возраст, лет, <i>M</i> (95%CI) $\pm$ SD	5,0 (4,5—5,5) $\pm$ 1,3	4,8 (4,4—5,3) $\pm$ 1,2
Сроки начала терапии, дни <i>M</i> (95%CI) $\pm$ SD	1,7 (1,3—2,1) $\pm$ 1,1	1,8 (1,3—2,3) $\pm$ 1,3

По показаниям допускалось проведение местной или системной антибактериальной терапии, не являвшейся поводом исключения из исследования.

В качестве этиотропной терапии применялся Эргоферон (1-я группа) или плацебо (2-я группа), в зависимости от распределения в группу. Препараты применялись по рекомендуемой лечебной схеме: в первые 2 часа лечения — 5 раз по 1 таблетке каждые 30 минут, в оставшееся до ночного сна время — ещё 3 приёма по 1 таблетке через примерно равные промежутки времени, в период со 2-го по 5-й день включительно — по 1 таблетке 3 раза в день. Всего для лечения эпизода ОРИ применялось 20 таблеток Эргоферона/плацебо, общая продолжительность курса составляла 5 дней.

Врач-исследователь ежедневно наблюдал детей, фиксируя результаты осмотров, анализов, обследования и назначения, а также подробную информацию о нежелательных явлениях в индивидуальной регистрационной карте (ИРК). В неё заносились также результаты ежедневной термометрии (утро/вечер). Выраженность симптомов оценивалась по 4-балльной шкале (от 0 — «отсутствует» до 3 — «сильно выражен»). Для комплексной оценки состояния использовались три групповых интегральных показателя: ИИ — индекс интоксикации (максимальное значение — 36 баллов)³, ИК — индекс катарального синдрома (максимальное значение — 24 балла)⁴, ИБ — индекс бронхообструкции (максимальное значение — 21 балл)⁵ и СКИ — суммарный клинический индекс (сумма ИИ, ИК и ИБ).

При завершающем осмотре врач-исследователь оценивал эффективность и безопасность терапии по модифицированным показателям шкалы CGI (Clinical global impression scale): диапазон значений показателя эффективности от «4» (максимальная эффективность при полном отсутствии побочных эффектов), до «1» (полное отсутствие улучшения или ухудшение состояния); диапазон оценок безопасности — от «1» (нежелательные явления отсутствуют) до «0,25» (выраженность нежелательных явлений превышает терапевтический эффект). Дополнительно побалльно оценивалась эффективность терапии ОРИ (в целом и бронхообструктивного синдрома) и переносимость лечения.

Анализ и оценка полученных данных проводились с помощью стандартных методов параметрической и непараметрической статистики. Результаты представляли в виде средней арифметической (*M*), среднеквадратического отклонения (*SD*) и доверительных интервалов (95%CI). Сравнение количественных данных двух независимых выборок выполнялось с использованием *U*-теста Манна-Уитни. Для оценки динамики количественных данных во времени использовался дисперсионный анализ повторных измерений, а в некоторых случаях — сравнивалась с помощью *U*-теста Манна — Уитни площадь

под «кривой». Для оценки распределения качественных признаков в группах применялся частотный анализ. Сравнение частот для межгрупповых различий осуществлялось с использованием критериев χ^2 Пирсона и двустороннего критерия Фишера (в зависимости от величины сравниваемых частот), для внутригруппового анализа — с использованием критерия χ^2 -Макнемара. Величина ошибки первого рода (α) была установлена на уровне $p=0,05$, в случае оценки результатов множественных измерений, величина ошибки первого рода корректировалась в соответствии с методом Бонферрони. Все расчёты проводились с помощью пакета STATISTICA v.10⁶.

Результаты исследования

В исследование было включено 54 ребенка, которые в результате рандомизации были распределены на две группы (табл. 1): 1-я группа — получавших Эргоферон (26 детей) и 2-я группа — получавших плацебо (28 детей). Дети наблюдались на протяжении 9 суток (скрининг и 8 дней наблюдения). При этом на 8-е сутки 7 пациентов из 1-й группы досрочно завершили участие в исследовании в связи с выздоровлением, 9-й осмотр был проведён у 19 и 28 детей из 1-й и 2-й групп соответственно. Оценка терапевтических эффектов и регистрация нежелательных явлений с оценкой безопасности препаратов проводились среди всех участников исследования.

В среднем, дети госпитализировались на вторые сутки от начала заболевания с колебаниями от 1 до 4 суток. Примерно у трети пациентов в группах до настоящей госпитализации были диагностированы атопический дерматит, хронические очаги инфекции ротоносоглотки, у 26,9% пациентов из 1-й группы и у 21,4% из 2-й — отмечалось сочетание указанных патологий.

Статистически значимых различий в клинической картине заболевания на догоспитальном этапе и при поступлении в стационар между группами выявлено не было (табл. 2).

Таким образом, группы были сравнимы по полу, возрасту, срокам госпитализации и начала терапии, спектру фоновых заболеваний и исходным клиническим данным.

³ Сумма показателей утренней и вечерней температуры тела (баллы), озноба, слабости, снижения аппетита, нарушения сна, потливости, головной боли, боли в животе, в мышцах, в суставах и в глазных яблоках.

⁴ Сумма показателей катаральных симптомов: конъюнктивит, заложенность носа, слизисто-серозный насморк, слизисто-гнойный насморк, осиплость голоса, боль в горле, гиперемия зева, кашель.

⁵ Сумма показателей следующих симптомов: вздутие податливых мест грудной клетки, участие вспомогательной мускулатуры в акте дыхания, эмфизема, коробочный оттенок при перкуссии, пролонгированный выдох при аускультации, свистящие хрипы, слышимые дистанционно и при аускультации.

⁶ Лицензия BXXR312G214930B10-7.

Таблица 2. Исходные клинические характеристики сравниваемых групп

Показатели	Группы	
	1-я	2-я
Максимально повышение температуры тела на догоспитальном этапе, °С М (95%CI) ±SD	38,1 (37,8—38,4)±0,81	37,9 (37,5—38,2)±0,90
Сроки от максимального подъема температуры тела до госпитализации, дни М (95%CI) ±SD	0,5 (0,2—0,9)±0,86	0,5 (0,2—0,7)±0,69
Сроки возникновения БОС от начала заболевания, дни М (95%CI) ±SD	2,0 (1,7—2,3)±0,85	1,6 (1,3—2,0)±0,91
Состояние средней тяжести, %	100	100
Температура тела на 1-м визите, °С М (95%CI) ±SD	37,6 (37,3—37,9)±0,77	37,4 (37,1—37,7)±0,74
ИИ, балл. М (95%CI) ±SD	12,0 (10,2—13,8)±4,45	10,9 (9,4—12,3)±3,75
ИК, балл. М (95%CI) ±SD	13,2 (12,3—14,0)±2,19	13,0 (12,—13,6)±1,57
ИБ, балл. М (95%CI) ±SD	9,2 (7,8—10,6)±3,37	8,6 (7,8—9,3)±1,99
СКИ, балл. М (95%CI) ±SD	34,4 (31,3—37,5)±7,72	32,4 (30,6—34,3)±4,80

У всех детей при включении в исследование методом качественной ПЦР в мазках из носоглотки оценено наличие респираторных вирусов. В 1-й группе у 9 человек были получены отрицательные результаты. У 8 детей выделялась РНК риновируса (РВ), у 4 больных — РНК вируса гриппа В (ВГрВ), у 1 ребёнка — РНК респираторно-синцитиального вируса (РСВ). У 3 пациентов 1-й группы в мазках со слизистой носоглотки выявлялись нуклеиновые кислоты нескольких возбудителей: по одному случаю — комбинация РНК от двух возбудителей: РВ и вирус парагриппа (ВПГр) 3-го типа, РСВ и РГрВ, в одном случае — были выявлены РНК сразу 3-х возбудителей: ВГрВ, РСВ и РВ. Во 2-й группе у 7 детей вирусы не были обнаружены. Среди положительных результатов ПЦР-диагностики доминировали РВ (13 больных), у одного из которых риновирус определялся в комбинации с

РСВ. У трёх больных были выделены РНК РСВ, у двух — РНК ВПГр 2-го типа, и по одному ребёнку с РНК вируса ВГрВ, ВПГр 4-го типа и метапневмовируса. Таким образом, значимых различий в частоте выделения и структуре вирусов между группами выявлено не было.

Общепринятым критерием эффективности терапии ОРВИ является нормализация температуры тела. В обеих группах средние показатели утренней и вечерней температуры снизились до нормального уровня уже по завершению вторых суток терапии при отсутствии значимых межгрупповых различий (рис. 1).

Результаты проведённого частотного анализа позволили более подробно оценить динамику температуры в группах на фоне проводимого лечения (табл. 3). В 1-й группе все дети достигли нормальных значений утренней температуры уже к окончанию 3-х суток терапии, в то время как во

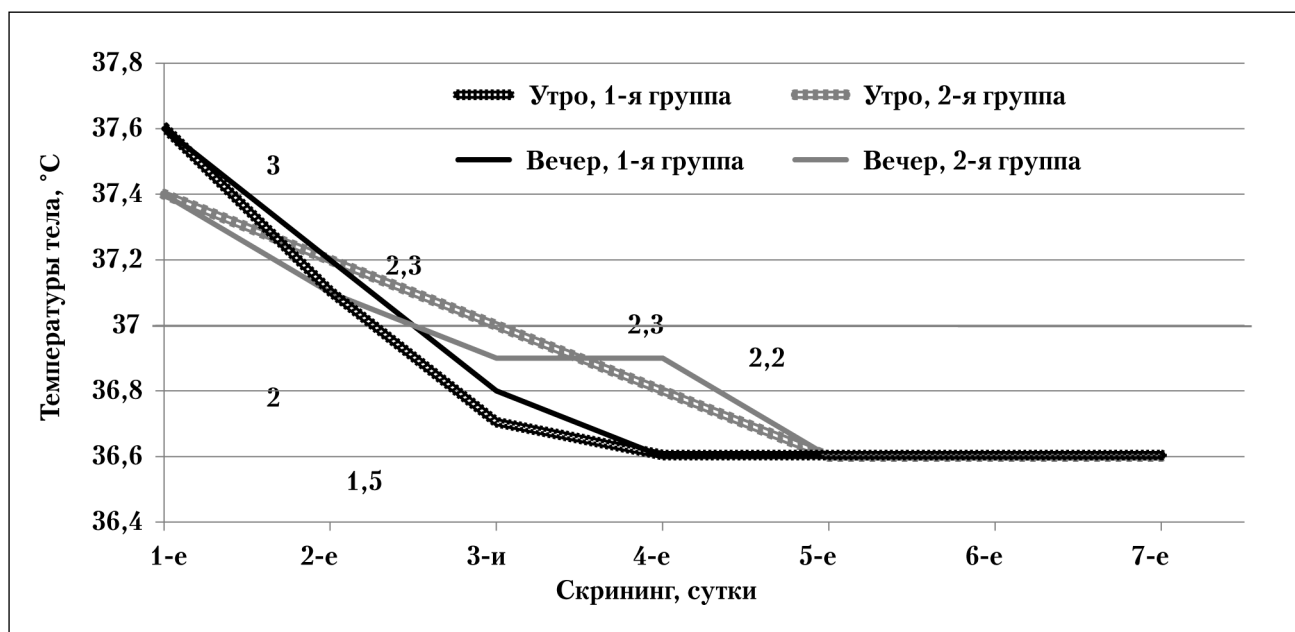


Рис. 1. Динамика средних показателей температуры (утренние и вечерние измерения)

Таблица 3. Данные частотного анализа результатов измерений утренней температуры тела (в %)

Группа	Т тела, °С	Дни наблюдения					
		1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й
1-я, %	<37,1	11	46	88*	100#	100	100
	37,1—37,9	62	50	12	0	0	0
	38—38,9	15	4	0	0	0	0
	>38,9	12	0	0	0	0	0
2-я, %	<37,1	39*	64	53	71	96	100
	37,1—37,9	43	25	43	29	4	0
	38—38,9	18	0	4	0	0	0
	>38,9	0	0	0	0	0	0

Примечание. * — межгрупповые различия статистически значимы, 2-сторонний F-критерий, $p=0,03$; ** — межгрупповые различия статистически значимы, критерий χ^2 , $p=0,0071$; # — межгрупповые различия статистически значимы, 2-сторонний F-критерий, $p=0,005$.

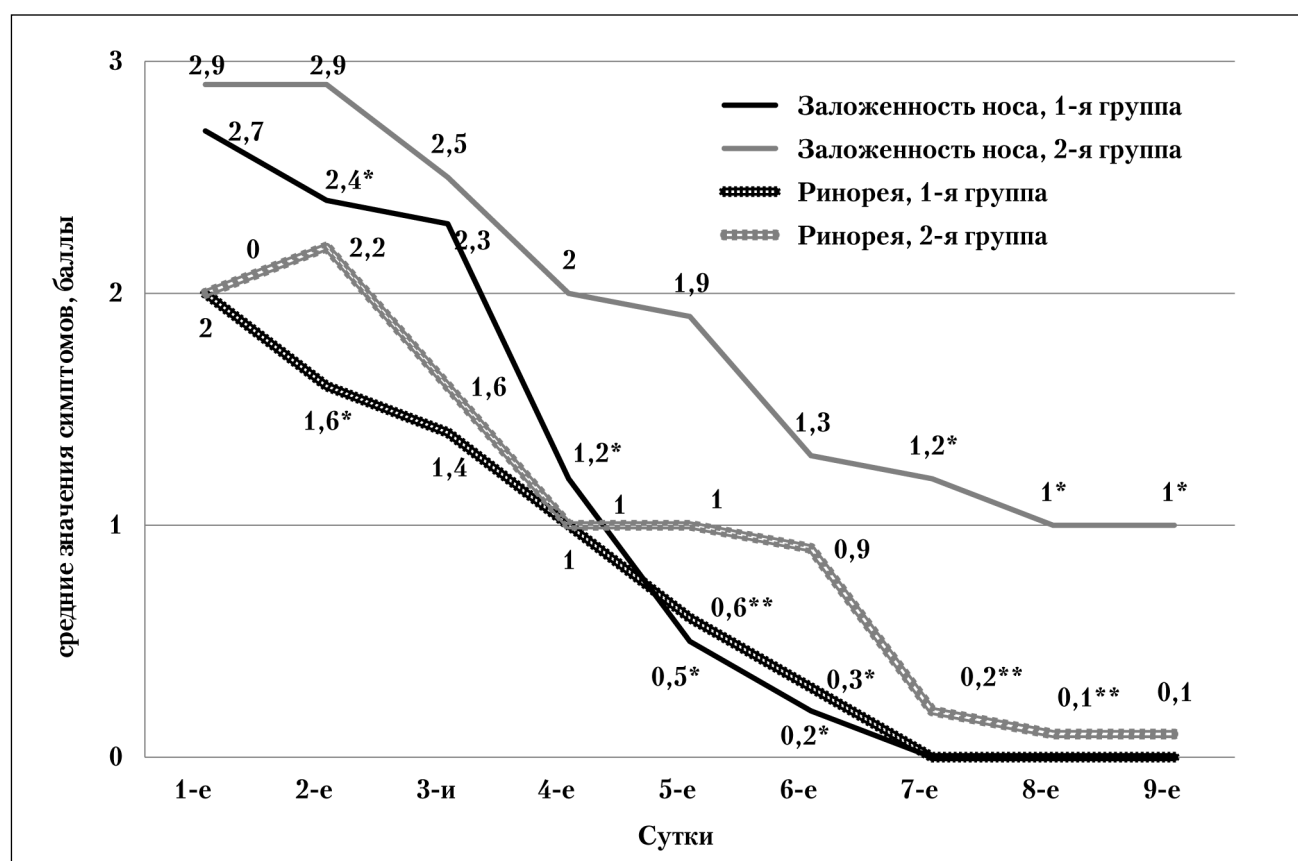


Рис. 2. Динамика заложенности носа и ринореи у детей.

* — межгрупповые различия статистически значимы, U-критерий, $p<0,001$; ** — межгрупповые различия статистически значимы, U-критерий, $p<0,05$.

2-й группе это было отмечено у всех пациентов лишь на 6-е сутки наблюдения даже с учётом того, что исходно во 2-й группе доля детей с нормальной температурой тела была в 3,5 раза большей. При анализе изменений вечерней температуры тела была получена аналогичная закономерность: на четвёртые сутки наблюдения 100% пациентов 1-й группы имели нормальную температуру тела. Во 2-й группе аналогичный результат был получен на пятые сутки.

Статистический анализ в пересчёте на число пациентов, исходно имевших повышенную тем-

пературу (23 пациента из 1-й группы и 17 — из 2-й), подтвердил, что в 1-й группе температура нормализовалась более быстро (доля детей с нормальной температурой на третьи и четвёртые сутки лечения была значимо большей, F-критерий, $p<0,001$). В 1-й группе средние сроки достижения нормальной температуры в утренних и вечерних измерениях составили: $1,6 (1,4—1,9) \pm 0,6$ сут и $1,9 (1,7—2,1) \pm 0,4$ сут, соответственно. Во 2-й группе в среднем утренняя и вечерняя температура тела достигала нормальных значений на $2,7 (2,1—3,3) \pm 1,2$ сут и $2,3 (1,9—2,7) \pm 0,8$ сут, соот-

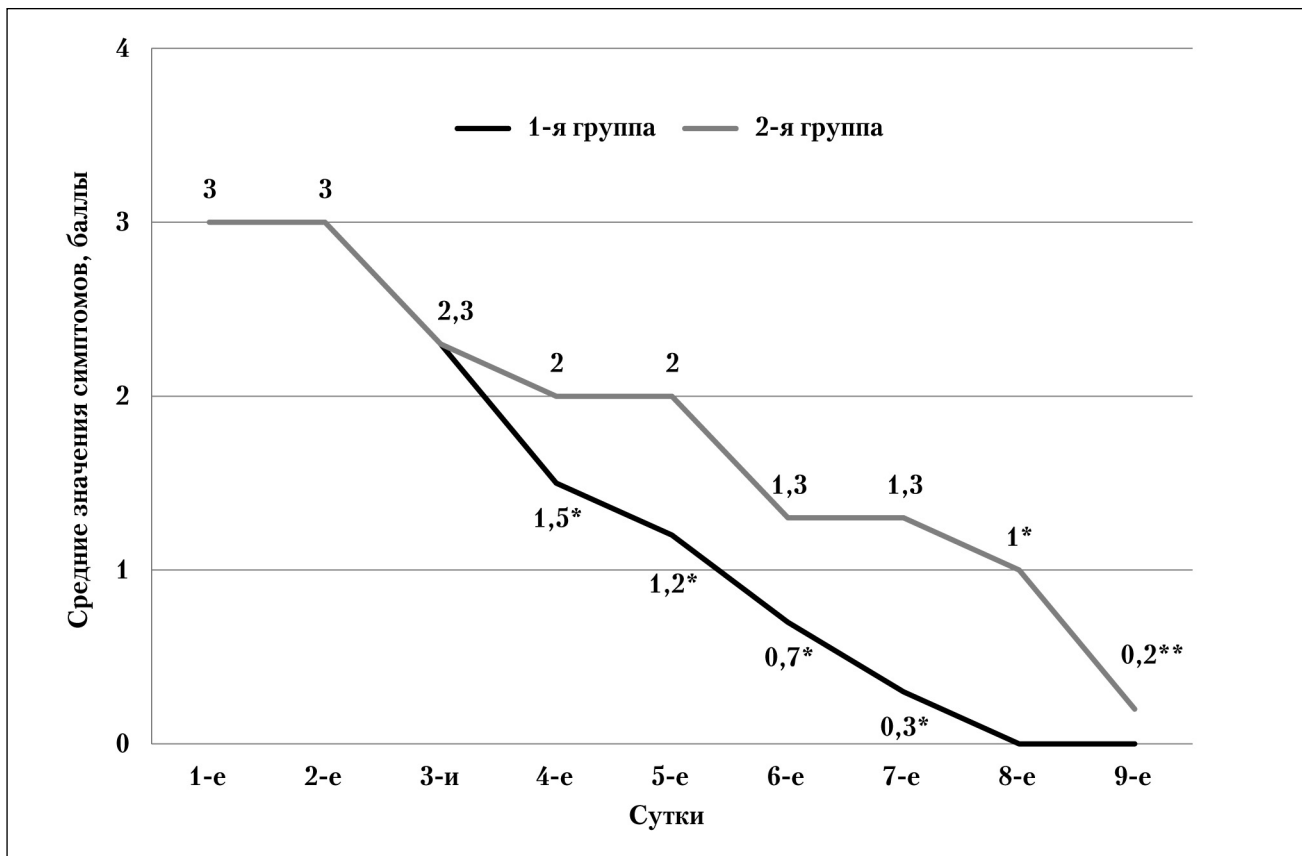


Рис. 3. Динамика выраженности кашля.

* — межгрупповые различия статистически значимы, U -критерий, $p < 0,001$; ** — межгрупповые различия статистически значимы, U -критерий, $p < 0,05$.

ответственно (U -критерий для утренних измерений, $p = 0,002$). Площадь под кривой показателя температуры тела была статистически значимо меньшей в 1-й группе: $514,3 (513,8—514,9) \pm 1,4$ ($^{\circ}\text{C} \times \text{дни}$) против $516,3 (515,1—517,5) \pm 2,5$ ($^{\circ}\text{C} \times \text{дни}$) во 2-й группе, U -критерий для суточных измерений, $p = 0,002$.

У трёх пациентов из 2-й группы в ходе лечения отмечалось повышение температуры вплоть до 4-го дня наблюдения. На момент включения в исследование температура тела у них была близка субфебрильной, и подъём до $37,5—37,6^{\circ}\text{C}$ начинался после непродолжительного периода нормальной температуры. Врач-исследователь оценил данную динамику как возможное развитие осложнений (с учётом усиления клинических проявлений) и назначил им антибактериальную терапию. По результатам ПЦР среди данных больных у одного ребёнка были выделены РНК РВ, ВПГр 4-го типа и у одного ребёнка результат ПЦР-детекции оказался отрицательным. В 1-й группе подобной отрицательной динамики не наблюдалось.

Выраженность затруднения носового дыхания, насморка со слизисто-серозными выделениями и кашля под влиянием проводимой терапии

уменьшалась в обеих группах (рис. 2, 3), однако в 1-й группе купирование симптомов происходило в более короткие сроки, статистически значимо отличаясь от изменений, регистрировавшихся во 2-й группе. Нормализация носового дыхания в 1-й группе в среднем происходила к пятым суткам: $4,5 (4,1—4,9) \pm 0,95$ сут. Во 2-й группе незначительно выраженная симптоматика сохранялась вплоть до девярых суток ($9,0 \pm 0,95$ сут, $p < 0,05$). Полное купирование ринита достигалось в среднем к четвёртым суткам в 1-й группе — $4,1 (3,5—4,6 \pm 1,41)$ и на сутки позже во 2-й группе — $5,3 (4,3—6,3) \pm 2,66$, $p < 0,05$. Кашель перестал беспокоить детей к шестым суткам в 1-й группе и к восьмым суткам — во 2-й группе, средние сроки составили $5,8 (5,4—6,2) \pm 1,1$ и $8,2 (8,1—8,4) \pm 0,4$ сут, соответственно. В целом, спустя 3-е суток лечения средние значения ИК снизились в 2,9 раз и в 1,6 раза в 1-й и во 2-й группах, соответственно. Средние значения ИК в группах на четвёртые сутки наблюдения различались в 1,8 раза, на пятые сутки — в 2,3 раза, а на шестые сутки — в 3,2 раза (1,2 балла — в 1-й группе и 3,8 балла — во 2-й группе). Средние сроки достижения минимальных значений ИК в 1-й группе составили $6,0 (5,7—6,3) \pm 0,8$ сут против 9,0 сут во 2-й группе (одновыборочный t -крите-

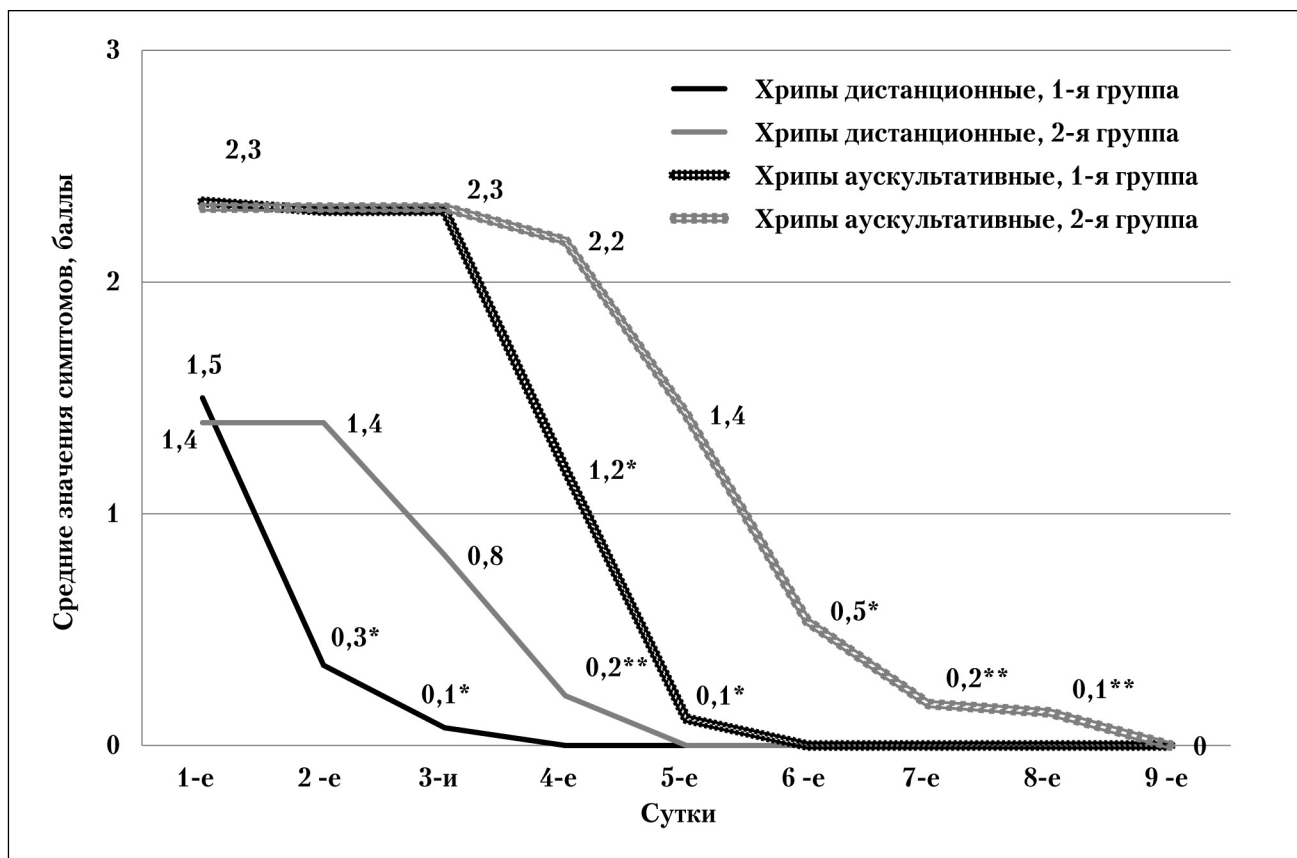


Рис. 4. Динамика выраженности хрипов на фоне лечения.

* — межгрупповые различия статистически значимы, *U*-критерий, $p < 0,001$; ** — межгрупповые различия статистически значимы, *U*-критерий, $p < 0,05$.

рий, $p < 0,001$). По данным частотного анализа, на третьи сутки наблюдения 77% детей в 1-й группе и 68% — во 2-й достигли состояния, при котором среднее значение ИК было менее 10 баллов. Ещё через сутки все пациенты в обеих группах имели значения ИК, не превышавшие 10 баллов, вместе с тем, в 1-й группе у 8% детей ИК достиг нулевого уровня ($p > 0,05$). По мере продолжения терапии в 1-й группе доля детей, у которых полностью купировался катаральный синдром, прогрессивно увеличивалась (27 и 77% на шестые и седьмые сутки, соответственно), достигнув 100% к восьмым суткам наблюдения. Во 2-й группе лёгкие катаральные проявления, не требовавшие медикаментозной терапии и наблюдения в стационаре, были зафиксированы и на девятые сутки наблюдения.

Синдром обструкции дыхательных путей был основным показанием к госпитализации пациентов. Его динамика существенно различалась в анализируемых группах, несмотря на то что терапия в них отличалась только включением Эргоферона у детей 1-й группы. Хрипы, слышимые дистанционно и определяемые при аускультации, значительно быстрее нивелировались у пациентов из 1-й группы (рис. 4). В среднем, больные из-

бавлялись от дистанционных хрипов на вторые сутки в 1-й группе ($1,4 (1,1-1,7) \pm 0,6$) и на третьи сутки — во 2-й группе ($2,9 (2,6-3,1) \pm 0,7$, $p < 0,05$). Сроки исчезновения аускультативных признаков бронхиальной обструкции у детей из 1-й группы составили $4,1 (4,0-4,2) \pm 0,3$ суток, а во 2-й группе — $6,9 (6,7-7,0) \pm 0,4$ сут ($p < 0,05$). Аналогичной была динамика других признаков обструкции — выраженности эмфиземы, удлинения выдоха, участия вспомогательной мускулатуры в акте дыхания. В целом, через двое суток лечения средние значения ИБ снизились более, чем в 2 раза (в 1-й группе — в 2,9 раза, во 2-й — в 2,2 раза), нулевые значения у показателей отмечены к шестым и девятым суткам в 1-й и во 2-й группах, соответственно. Средние сроки достижения минимальных (нулевых) значений ИБ в группах составили в 1-й группе $4,1 (4,0-4,2) \pm 0,33$ сут и $6,9 (6,7-7,0) \pm 0,36$ сут во 2-й группе (*U*-критерий, $p < 0,001$). Результаты частотного анализа совпали с динамикой средних показателей ИБ: полное купирование бронхиальной обструкции у всех пациентов 1-й группы было зафиксировано на шестые, а во 2-й группе — на девятые сутки наблюдения. У 8 детей из 2-й группы (включая 3-х детей с подъёмом температуры), несмотря на проводимое лечение,

Таблица 4. Данные частотного анализа динамики значений СКИ, %

Группа	Уровень баллов	Дни наблюдения								
		1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й
1-я	0	0	0	0	0	8	27	77	100	100
	<21	0	81*	85	100	92	73	23	0	0
	21–44	85	19	15	0	0	0	0	0	0
	>44	15	0	0	0	0	0	0	0	0
2-я	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<21	0	29	82	100	100	100	100	100	100
	24–44	96	71	18	0	0	0	0	0	0
	>41	4	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. * — межгрупповые различия статистически значимы, 2-сторонний F-критерий, $p=0,03$.

в первые 3–4 дня терапии отмечалось умеренное усиление выраженности БОС: усиление хрипов и коробочного звука при перкуссии, участие вспомогательной мускулатуры и удлинение выдоха. В 1-й группе ни у одного ребёнка не было зарегистрировано нарастание синдрома бронхиальной обструкции.

Показатели выраженности синдрома интоксикации отражали описанные тенденции ликвидации катаральных признаков и обструкции дыхательных путей. Средние значения ИИ в 1-й группе достигали нулевых значений к третьим суткам — $2,8 (2,5–3,1) \pm 0,80$, а нормализация ИИ у всех детей из 1-й группы регистрировалась к пятым суткам. Во 2-й группе в среднем нормализация ИИ происходила к исходу пятых суток — $4,5 (4,1–4,8) \pm 0,96$, у всех пациентов ИИ достиг минимума на седьмые сутки наблюдения, $p < 0,001$.

По данным частотного анализа, доли детей с полным выздоровлением в 1-й группе были большими, начиная с пятого дня (табл. 4). Во 2-й группе ни один ребёнок не имел нулевых значений СКИ на девятые сутки, хотя среднее значение СКИ во 2-й группе составляло $1,3 (1,1–1,5) \pm 0,46$, больные не нуждались в продолжении стационарного лечения. Средний срок достижения пациентами 1-й группы нулевого значения СКИ, оцениваемый по дню наблюдения, на котором был зарегистрирован данный результат, составил $6,0 (5,7–6,3) \pm 0,8$ суток против $9,0$ суток во 2-й группе (одновыборочный t -критерий, $p < 0,001$).

В ходе проведения исследования не было зарегистрировано каких-либо побочных эффектов, связанных с приёмом принимаемых препаратов.

Среднее значение оценки эффективности терапии в 1-й группе составило $3,7 (3,5–3,8) \pm 0,49$ балла против $2,6 (2,3–2,9) \pm 0,69$ балла во 2-й группе ($p < 0,005$). Родители оценивали эффективность терапии ОРИ в среднем близко к максимальной оценке — $4,7 (4,5–4,9) \pm 0,45$. Во 2-й группе родительская оценка терапии также была положительной, но статистически значимо отличалась от 1-й группы — $3,0 (2,3–3,8) \pm 1,86$. Такая же закономерность отмечалась в оценках эффективности лечения БОС: $3,7 (3,4–3,9) \pm 0,57$ и $2,2$

$(1,7–2,7) \pm 1,29$ для 1-й и 2-й групп, соответственно. С учётом того, что ни в одном случае в ходе проведения исследования не было зафиксировано развития нежелательных явлений, врачебная оценка безопасности/переносимости по шкале CGI была максимальной в обеих группах. В то же время переносимость терапии, субъективно оцениваемая родителями детей, статистически значимо различалась: в 1-й группе она составила $3,6 (3,4–3,8) \pm 0,57$ балла, во 2-й группе — $2,5 (1,8–2,9) \pm 1,31$ балла (рис. 5).

Обсуждение результатов

Острые респираторные инфекции, как правило, проявляются катаральным синдромом и интоксикацией. Степень выраженности интоксикации и топика проявлений катаральных симптомов зависят от целого ряда факторов, но, в значительной мере, — от вида и свойств возбудителя заболевания, состояния организма ребёнка, воздействия факторов окружающей среды, особенно табачного дыма. Основой для развития воспаления дыхательных путей является нарушение барьерных функций респираторного эпителия, неспецифического и специфического звеньев противоинфекционной защиты. В ряде случаев при сочетании характеристик возбудителя и предрасполагающих факторов со стороны организма ребенка (возраст, наличие очагов хронической инфекции и/или аллергических заболеваний и др.) катаральный симптомокомплекс со стороны верхних дыхательных путей при ОРИ дополняется синдромом бронхиальной обструкции, в основе которой лежит отёк разной степени выраженности, гиперсекреция (обычно вязкой слизи, что существенно ухудшает её реологические свойства) и спазм гладкой мускулатуры бронхов. Соотношение этих факторов различно у каждого ребёнка, но активный механизм обструкции у детей раннего возраста играет меньшую роль по сравнению с пассивными, формирующимися вследствие воспалительной реакции. Все проявления заболевания запускаются и поддерживаются едиными механизмами, и для их быстрого купирования требуется комплексное терапевтическое воздействие. Традиционно для лечения ОРИ приме-

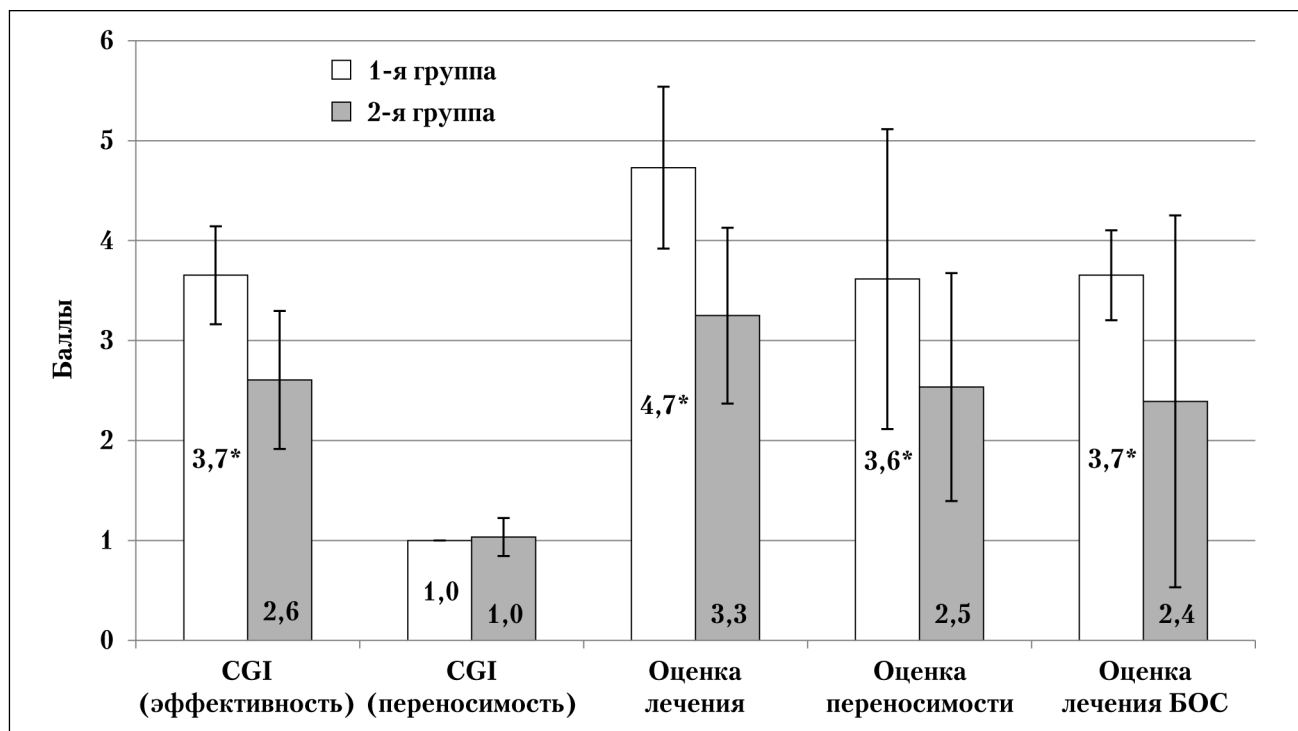


Рис. 5. Оценки эффективности и переносимости терапии.

* — межгрупповые различия статистически значимы, U-критерий, $p < 0,005$.

няется терапия, имеющая в своем составе этиотропное средство, ряд симптоматических медикаментов (жаропонижающее, сосудосуживающее), ряд препаратов, направленных на лечение местного воспаления (комплексные препараты с местным антисептическим и противовоспалительным действием, местно действующие антибактериальные препараты), а также средства для контроля кашля. Таким образом, лечение ОРИ с развитием острого обструктивного бронхита предусматривает применение сложной терапевтической схемы, содержащей большое количество компонентов и требующей обязательного учёта их совместимости. Перспективным является применение препаратов, которые сами по себе могут оказывать многоцелевое действие на основные звенья патогенеза заболевания.

В данном исследовании в качестве такого препарата был выбран Эргоферон, который обладает выраженным противовирусным действием в отношении широкого спектра возбудителей ОРИ, регулирующим влиянием на компоненты иммунного воспаления, а также значительным противовоспалительным и антигистаминным потенциалом [25, 26]. Включение в схему терапии Эргоферона позволило существенно сократить выраженность и продолжительность течения респираторных инфекций как в целом, так и отдельных её симптомов. Важным результатом данной работы является оценка динамики синдрома бронхиальной обструкции, протоколы терапии

которой не совершенны. В результате применения препарата по сравнению с плацебо была отмечена более быстрая динамика клинической картины всех симптомов, что отражает эффективность контроля пассивных и активных механизмов обструкции дыхательных путей, это существенно улучшает качество жизни пациентов, в том числе по результатам оценки родителей. Возможность Эргоферона обеспечивать синергидное влияние на механизмы противовирусной защиты (продукция и рецепция интерферона-гамма, а также продукция интерферонов-альфа/бета, активность процессов распознавания вирусов и других возбудителей ОРИ через активацию CD4+ клеток) позволяет добиваться предотвращения развития бактериальных осложнений, поэтому в 1-й группе не было зарегистрировано ни одного случая ухудшения течения ОРИ, в то время как среди детей, получавших в составе комплексной терапии ОРИ плацебо, было зафиксировано 3 случая назначения антибактериальных препаратов в связи с появлениями признаков развивающегося бактериального осложнения, а также усиление выраженности БОС у 8 больных, потребовавшее увеличения объёма терапии.

Таким образом, Эргоферон продемонстрировал статистически значимое превосходство над плацебо при терапии острого обструктивного бронхита у дошкольников, что позволяет оптимизировать подходы к терапии и сократить сроки лечения этих пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

- Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–октябрь 2016 г. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.rosпотреbnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=7399 (дата обращения: 22.11.2016) / Infekcionnaja zaboljevaemost' v Rossijskoj Federacii za janvar'-oktjabr' 2016 g. [Elektronnyj resurs] Rezhim dostupa: http://www.rosпотреbnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=7399 (data obrashhenija: 22.11.2016). [in Russian]
- Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–декабрь 2015 г. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.rosпотреbnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=5525 (дата обращения: 09.11.2016) / Infekcionnaja zaboljevaemost' v Rossijskoj Federacii za janvar'-dekabr' 2015 g. [Elektronnyj resurs] Rezhim dostupa: http://www.rosпотреbnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=5525 (data obrashhenija: 09.11.2016). [in Russian]
- Волков И. К. Дифференциальная диагностика бронхообструктивного синдрома у детей. МНС. 2013; 1: 48: 125–128. / Volkov I. K. Differencial'naja diagnostika bronhoobstruktivnogo sindroma u detej. MNS. 2013; 1: 48: 125–128. [in Russian]
- Beigelman A., Bacharier L.B. Infection-induced wheezing in young children. J Allergy Clin Immunol 2014 Feb; 133: 2: 603–604.
- Sun H., Sun Q., Jiang W. et al. Prevalence of rhinovirus in wheezing children: a comparison with respiratory syncytial virus wheezing. Braz J Infect Dis. 2016 Mar–Apr; 20: 2: 179–183.
- García-García M.L., Calvo C., Falcón A. et al. Role of emerging respiratory viruses in children with severe acute wheezing. Pediatr Pulmonol 2010 Jun; 45: 6: 585–591.
- Gern J.E. Virus/allergen interaction in asthma exacerbation. Ann Am Thorac Soc 2015 Nov; 12: Suppl 2: S137–43.
- Busse W.W., Lemanske R. F., Gern J.E. The role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. Lancet. 2010 September 4; 376: 9743: 826–834.
- Ritchie A.I., Jackson D.J., Edwards M.R. et al. Airway epithelial orchestration of innate immune function in response to virus infection. A Focus on Asthma. Ann Am Thorac Soc 2016 Mar; 13: Suppl 1: S55–63.
- Kim T.K., Bheda-Malge A., Lin Y. et al. A system approach to understanding human rhinovirus and influenza virus infection. Virology. 2015 Dec; 486: 146–157.
- El Saleeby C.M., Bush A.J., Harrison L.M. et al. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. J Infect Dis 2011 Oct 1; 204: 7: 996–1002.
- Liesman R.M., Buchholz U.J., Luongo C.L. et al. RSV-encoded NS2 promotes epithelial cell shedding and distal airway obstruction. J Clin Invest 2014; 124: 2219–2233.
- Baraldo S., Contoli M., Bazzan E. et al. Deficient antiviral immune responses in childhood: distinct roles of atopy and asthma. J Allergy Clin Immunol 2012; 130: 1307–1314.
- Busse W.W., Lemanske R. F., Gern J.E. The role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. Lancet. 2010 September 4; 376: 9743: 826–834.
- Зайцева С.В. Особенности терапии бронхообструктивного синдрома у детей с острыми респираторными инфекциями. Практическая пульмонология. 2013; 1: 9–14. / Zajceva S.V. Osobennosti terapii bronhoobstruktivnogo sindroma u detej s ostrymi respiratornymi infekcijami. Prakticheskaja pul'monologija. 2013; 1: 9–14. [in Russian]
- Hayden F.G. Newer influenza antivirals, biotherapeutics and combinations. Influenza and Other Respiratory Viruses 2013; 7: 63–75.
- Hui D.S., Lee N., Chan P.K. Adjunctive therapies and immunomodulatory agents in the management of severe influenza. Antiviral Res 2013; 98: 410–416.
- Becker T.M., Durrani S.R., Bochkov Y.A. et al. Exogenous interferons reduce rhinovirus replication and alter airway inflammatory responses. Ann Allergy Asthma Immunol 2013; 111: 5: 397–401.
- Инструкция по медицинскому применению препарата Эргоферон. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?idReg=135031&=&svobodnyj (Дата обращения: 09.11.2016). / Instrukcija po medicinskomu primeneniju preparata Jergoferon. [Elektronnyj resurs] Rezhim dostupa: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?idReg=135031&=&svobodnyj (Data obrashhenija: 09.11.2016). [in Russian]
- Журавлёва М.В., Каменева Т. Р., Черных Т. М. и др. Сравнительная характеристика ряда препаратов для лечения острой респираторной вирусной инфекции и гриппа. Доктор.Ру. 2015; 13: 114: 12–19. / Zhuravljova M.V., Kameneva T. R., Chernyh T. M. i dr. Sravnitel'naja harakteristika rjada preparatov dlja lechenija ostroj respiratornoj virusnoj infekcii i grippa. Doktor.Ru. 2015; 13: 114: 12–19. [in Russian]
- Усенко Д.В. Эргоферон: результаты клинических исследований при ОРВИ у детей. Практ педиатр 2015; 4: 66–70. / Usenko D.V. Jergoferon: rezul'taty klinicheskikh issledovanij pri ORVI u detej. Praktika pediatri 2015; 4: 66–70. [in Russian]
- Rafalsky V., Averyanov A., Bart B. et al. Efficacy and safety of Ergoferon versus oseltamivir in adult outpatients with seasonal influenza virus infection: a multicenter, open-label, randomized trial. Int J Infect Dis 2016 Oct; 51: 47–55.
- Шиловский И.П., Корнилова Г.В., Хаитов М.Р. Новые возможности в терапии респираторно-синцитиальной вирусной инфекции: данные доклинического исследования препарата Эргоферон. Иммунология 2012; 33: 3: 144–148. / Shilovskij I.P., Kornilova G.V., Haitov M.R. Novye vozmozhnosti v terapii respiratorno-sincital'noj virusnoj infekcii: dannye doklinicheskogo issledovanija preparata Jergoferon. Immunologija 2012; 33: 3: 144–148. [in Russian]
- Шиловский И.П., Прозорова М.С., Хаитов М.Р. Способность препарата Эргоферон подавлять инфицирующую активность респираторно-синцитиального вируса in vitro. Иммунология. 2015; 36: 4: 216–219. / Shilovskij I.P., Prozorova M.S., Haitov M.R. Sposobnost' preparata Jergoferon podavljat' inficirujushhiju aktivnost' respiratorno-sincital'nogo virusa in vitro. Immunologija. 2015; 36: 4: 216–219. [in Russian]
- Кондюрина Е.Г., Заплатников А.Л., Елкина Т.Н. и др. Многоплановая оценка схем терапии острых респираторных инфекций в условиях рутинной педиатрической практики. Антибиотики и химиотерапия 2016; 61: 5–6: 8–20. / Kondjurina E.G., Zaplatnikov A.L., Elkina T.N. i dr. Mnogoplanovaja ocenka shem terapii ostryh respiratornyh infekcij v uslovijah rutinnoj pediatricheskoj praktiki. Antibiotiki i himioter 2016; 61: 5–6: 8–20. [in Russian]
- Секирина М.А., Тарасов С.А., Горбунов Е.А. и др. Новые возможности в терапии бронхиальной астмы с использованием препаратов, содержащих релиз-активные антитела. IX Всероссийская конференция «Химия и медицина» с молодежной научной школой по органической химии. Уфа, 2013; 108–109. / Sekirina M.A., Tarasov S.A., Gorbunov E.A. i dr. Novye vozmozhnosti v terapii bronhial'noj astmy s ispol'zovaniem preparatov, soderzhashhih reliz-aktivnye antitela. IX Vserossijskaja konferencija «Himija i medicina» s molodezhnoj nauchnoj shkoloj po organicheskoj himii. Ufa, 2013; 108–109. [in Russian]
- Сабитов А.У., Ершова А.В. Оптимизация лечения острой респираторной вирусной инфекции у детей с бронхиальной астмой. Практ мед 2015; 2: 87: 85–90. / Sabitov A.U., Ershova A.V. Optimizacija lechenija ostroj respiratornoj virusnoj infekcii u detej s bronhial'noj astmoj. Prakt med 2015; 2: 87: 85–90. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кондюрина Елена Геннадиевна — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой педиатрии НГМУ, Новосибирск

Тюленева Ирина Олеговна — БУЗ НСО Коченевская ЦРБ, заведующая детским отделением, Новосибирская обл., рабочий поселок Коченево

Бурцева Елена Ивановна — д.м.н., заведующая лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа, Институт Вирусологии ФГБУ Федерального научно исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва

Трушакова Светлана Викторовна — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа, Институт Вирусологии ФГБУ Федераль-

ного научно исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва

Мукашева Евгения Андреевна — научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа, Институт Вирусологии ФГБУ Федерального научно исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва

Анастасия Анатольевна — аспирант кафедры педиатрии НГМУ ФПО, Новосибирск

Елкина Татьяна Николаевна — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой поликлинической педиатрии НГМУ, Новосибирск

Зеленская Вера Викторовна — д.м.н., профессор, профессор кафедры педиатрии НГМУ ФПО, Новосибирск

Клинические и микробиологические аспекты хронического эндометрита у женщин репродуктивного возраста

Л. А. МАРЧЕНКО, Г. Е. ЧЕРНУХА, О. В. ЯКУШЕВСКАЯ, Н. А. ГОМБОЛЕВСКАЯ,
В. В. МУРАВЬЕВА, Т. В. ПРИПУТНЕВИЧ, А. С. АНКИРСКАЯ

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

Clinical and Microbiological Aspects of Chronic Endometritis in Women of Reproductive Age

L. A. MARCHENKO, G. E. CHERNUKHA, O. V. YAKUSHEVSKAYA, N. A. GOMBOLEVSKAYA,
V. V. MURAVIEVA, T. V. PRIPUTNEVICH, A. S. ANKIRSKAYA

Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician Vladimir Kulakov, Moscow

Цель исследования. Оценка состояния микробиоценоза нижнего и верхнего отделов полового тракта при различных морфологических формах хронического эндометрита и полипах эндометрия. **Материал и методы.** Сопоставлены результаты гистологического исследования образцов ткани эндометрия с особенностями микробиоты влагалища и полости матки у 164 женщин репродуктивного возраста с различным характером менструального цикла и репродуктивным анамнезом. **Результаты.** Сравнение частоты выявления условно-патогенной микрофлоры в эндометрии пациенток с вагинальными инфекциями и нормоценозом показало, что риск колонизации эндометрия при нарушении микрофлоры вагинального биотопа в 3,5 раза выше, чем при нормоценозе. **Выводы.** Проведение микробиологической диагностики целесообразно рассматривать, как компонент комплексной диагностики, необходимый для выбора адекватной тактики ведения больных с хроническим эндометритом и полипом эндометрия.

Ключевые слова: хронический эндометрит, полип эндометрия, бесплодие, привычное невынашивание беременности, аномальные маточные кровотечения, нормоценоз, бактериальный вагиноз.

Objective. Estimation of microbiocenosis of lower and upper genital tract in different morphological forms of chronic endometritis and endometrial polyps. **Material and methods.** Histological examination of endometrial aspirates and microview of the lower and upper genital tract in 164 women of reproductive age with different character of menstrual and reproductive history. **Results.** The risk of endometrial colonization in disturbance microecology of the vagina is 3.5 times higher than that in patients with normocenosis ($p < 0.01$, OR=3.5 [95% CI 1.63–8.11]). **Conclusion.** The microbiological diagnosis can be considered as a component of comprehensive diagnostics necessary to choose the appropriate management of patients with CE and PE.

Key words: chronic endometritis, endometrial polyp, infertility, spontaneous preterm birth, abnormal uterine bleeding, normocenosis, bacterial vaginosis.

Введение

Хронический эндометрит (ХЭ) относят к категории недостаточно изученных патологических состояний эндометрия. Это обусловлено отсутствием надёжных клинических признаков заболевания и сложностью лабораторного подтверждения диагноза. Распространённость ХЭ, по данным литературы, варьирует от 0,2 до 66% (в среднем 14%) [1]. ХЭ может манифестировать различными типами аномальных маточных кровотечений (АМК) в сочетании с незначительными болями в нижних отделах живота, но может протекать бессимптомно, являясь причиной бесплодия, привычного невынашивания беременно-

сти (ПНБ), неудачных попыток переносов эмбрионов в полость матки в программе ЭКО [2–4]. Диагностика ХЭ основана на результатах морфологического исследования образцов ткани эндометрия, полученных в фазу пролиферации.

К морфологическим признакам воспаления слизистой оболочки матки относят наличие лимфоплазмноклеточных инфильтратов в строме эндометрия, её фиброзирование, а также склеротические изменения стенок спиральных артерий. Гистероскопическая картина ХЭ характеризуется наличием микрополипов эндометрия с очаговой или диффузной гиперемией слизистой оболочки матки. По мнению некоторых авторов, морфологические изменения при ХЭ и полипах эндометрия (ПЭ) во многом сходны и этиологически взаимосвязаны [5]. Однако чётких доказательств роли воспаления в генезе ПЭ не получено, а антибактериальная терапия, часто проводимая данно-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова

му контингенту больных с целью профилактики рецидивов ПЭ, носит, как правило, эмпирический характер.

Считается, что причиной ХЭ может стать проникновение в эндометрий условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), реже — абсолютных патогенов. В физиологических условиях микроорганизмы инактивируются системой врождённого и адаптивного иммунитета. На ранних этапах инфицирования этот процесс осуществляется за счёт Toll-Nod и Toll-Rig — подобных рецепторов, находящихся на поверхности клеток иммунной системы (моноцитов, лейкоцитов, дендритных клеток), на эпителиоцитах, эндотелиоцитах, фибробластах и др. Важная роль в ограничении воспаления принадлежит Toll-like рецепторам (TLRs), которые, взаимодействуя с паттернами микробных агентов (липополисахариды, белки бактериальных жгутиков, вирусная РНК и др.), стимулируют механизмы врождённой противомикробной резистентности. Развитие инфекционного процесса может сдерживаться природными антимикробными пептидами (1-4- β -дефензинами, лизоцимом и лактоферринами), присутствующими в эндометрии. В результате этих механизмов формируется защитная воспалительная реакция, направленная на эрадикацию инфекционного агента [6, 7].

Выявление возбудителя как пускового фактора развития ХЭ связано с рядом трудностей. К их числу относят сложность устранения контаминации образцов эндометрия вагинальной микрофлорой, которая уменьшает информативность результатов бактериологического исследования. Вместе с тем, лишь качественно выполненная микробиологическая диагностика может являться основанием для назначения адекватной этиотропной терапии.

Цель настоящего исследования — оценка микробиоценоза нижнего и верхнего отделов полового тракта при хроническом эндометрите и полипах эндометрия у женщин репродуктивного возраста.

Материал и методы

В исследование включены 164 женщины репродуктивного возраста (средний возраст — $31,8 \pm 2,3$ года), предъявлявшие жалобы на АМК, бесплодие, привычное невынашивание беременности или неэффективность двух и более переносов эмбрионов в программах ЭКО. Все пациентки до манипуляции обследованы на инфекции, передаваемые половым путём, и при наличии таковых, были исключены из исследования.

На 7–11-й день менструального цикла под гистероскопическим контролем производили кюретаж эндометрия ($n=60$) или аспирационную биопсию кюретками Pipelle de Cornier ($n=104$). Полученный материал направляли на гистологическое и микробиологическое исследование. ХЭ диагностировали по общепринятым критериям, включающим выявление в строме эндометрия:

1) воспалительных инфильтратов, состоящих преимущественно из лимфоидных элементов с включением макрофагов и эозинофилов, расположенных чаще вокруг желез и кровеносных сосудов, реже — диффузно;

2) плазматических клеток в инфильтратах;
3) очагового фиброизирования;
4) склеротических изменений стенок спиральных артерий. Полная морфологическая форма.

ХЭ диагностирована при наличии всех перечисленных признаков, неполная форма — при наличии одного морфологического признака, чаще первого. В соответствии с результатами гистологического исследования эндометрия были сформированы 4 группы: в первую группу включены пациентки с полной формой ХЭ (ПХЭ) ($n=38/23,2\%$), во вторую — с неполной ($n=92/56\%$) (НХЭ), в третью — с полипами эндометрия (ПЭ) ($n=15/9,2\%$), в четвёртую — с эндометрием в стадии пролиферации ($n=19/11,6\%$) (группа сравнения).

Микробиологическое исследование включало оценку микробиоценоза влагалища по результатам микроскопии мазка вагинального отделяемого, окрашенного по Граму, и культурального исследования в соответствии с медицинской технологией «Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища» [8]. В комплекс обследования входила диагностика оппортунистических вагинитов, а также изучение микрофлоры биоптатов эндометрия в аэробных, анаэробных и микроаэрофильных условиях культивирования. Для исключения контаминации биоптата эндометрия микрофлорой нижних отделов гениталий (после взятия на исследование вагинального содержимого) влагалище, шейку матки, цервикальный канал дважды обрабатывали антисептиком (октенисептом), при экспозиции — 5 мин. Вагинальное отделяемое и гомогенат биоптата эндометрия засеивали на стандартные питательные среды.

Для выделения факультативно-анаэробных микроорганизмов использовали: колумбийский агар, маннит-солевой агар (Conda, Испания), среду «Эндо» и агар Сабуро (ФГУН «ГИЦПМ и Б», Оболensk, Россия). Лактобактерии культивировали на среде «Лактобакагар» (ФГУН «ГИЦПМ и Б», Оболensk, Россия), строгие анаэробы — на прeredуцированном агаре Schaedler (Conda, Испания) с необходимыми добавками. Инкубировали посевы в условиях CO_2 инкубатора (Joan, Франция). Строгие анаэробы и лактобациллы культивировали в анаэробном боксе (Joan, Франция) в атмосфере трёхкомпонентной газовой смеси (N_2 — 80%; CO_2 — 10%; H_2 — 10%). Видовую идентификацию микроорганизмов проводили методом времяпролётной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS) с помощью масс-спектрометра AutoFlex III с программным обеспечением Maldi BioTyper 3.0 (Bruker Daltoniks, Германия).

Статистическая обработка проведена с применением пакета прикладных программ Statistica 7.0. Использовали непараметрический критерий Манна–Уитни для количественных признаков, метод χ^2 для сравнения дискретных величин, корреляционный анализ. Для всех видов анализа статистически значимым считали $p < 0,05$.

Результаты исследования

Оценка симптомов заболевания включала характеристику менструального цикла с определением типа АМК и анализ репродуктивного анамнеза (рис. 1, 2).

Как видно из данных, представленных на рис. 1, приблизительно у половины больных ХЭ, независимо от его морфологической формы, манифестировал различными типами АМК, при ПЭ их частота составила 66,7%. В структуре АМК как при ХЭ, так и при ПЭ доминировала комбинация обильных менструальных кровотечений (ОМК) и межменструальных мажущих кровотечений (ММК). В каждом пятом случае при ПЭ и в каждом десятом при ХЭ наблюдались ОМК.

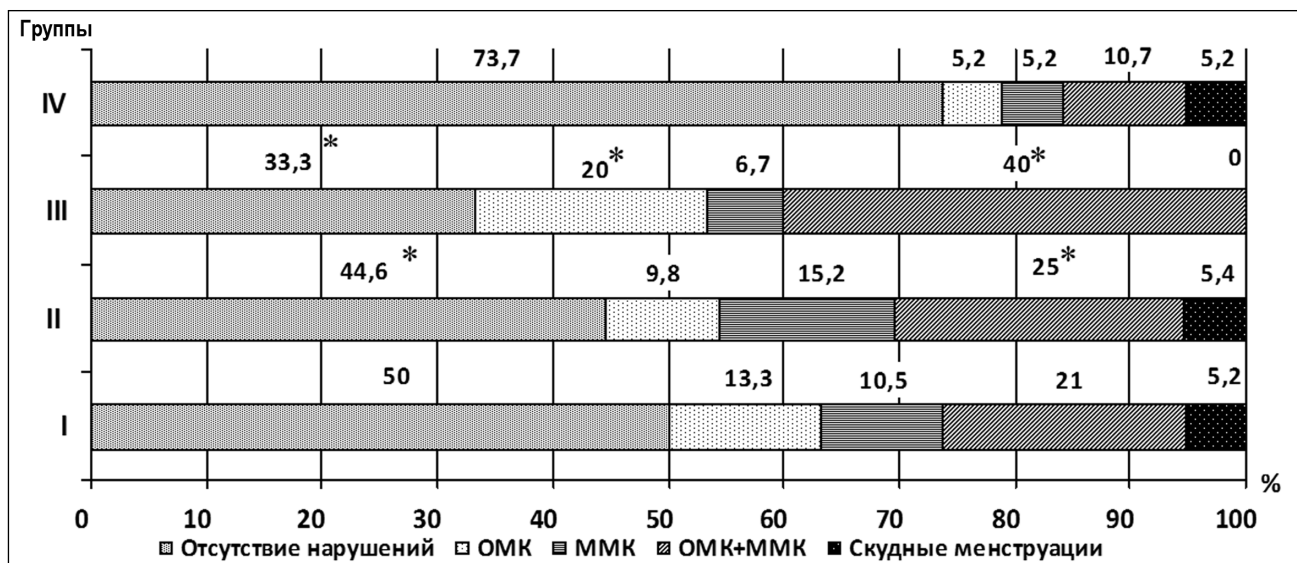


Рис. 1. Характер менструального цикла обследованных женщин (n=164).

Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с IV группой.

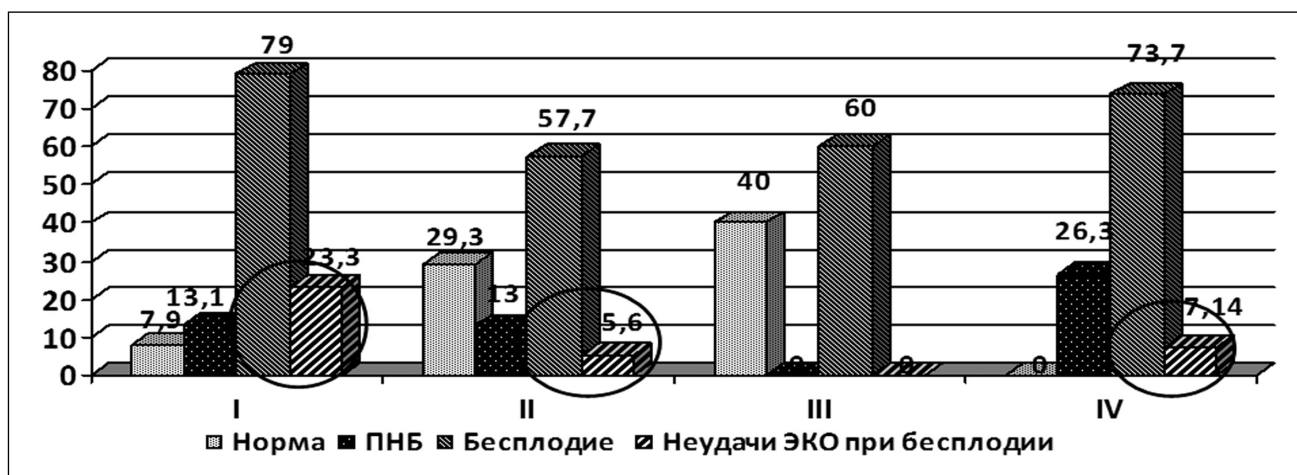


Рис. 2. Некоторые показатели репродуктивного анамнеза обследованных пациенток (в %) при сравнении между группами.

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении I–II; ** – $p < 0,05$ – I–III; *** – $p < 0,05$ – II–IV; **** – $p < 0,05$ – III–IV группой.

Скудные менструации при ХЭ отмечались лишь в 5% случаев, что соответствовало их частоте среди женщин с отсутствием патологии эндометрия. Полученные данные дают основание считать, что клиническая картина полной и неполной морфологических форм ХЭ не является специфичной, АМК более характерны для ПЭ.

Исходя из данных рис. 2, можно сделать вывод о том, что подавляющее большинство больных с ПХЭ и каждая вторая с НХЭ предъявляли жалобы на бесплодие, примерно каждая десятая — на ПНБ. Неудачи программы ЭКО чаще наблюдали у пациенток с ПХЭ (в 23,3% случаев), по сравнению с НХЭ и группой пациенток без признаков патологии эндометрия, у которых частота

данного показателя составила 5,6 и 7,14%, соответственно. Для больных с ПЭ ПНБ не характерно, однако в каждом втором случае отмечалось бесплодие. Схожая с ХЭ структура нарушений репродуктивной функции у больных с отсутствием патологии эндометрия подтверждает факт взаимосвязи ПНБ и бесплодия с воспалительными изменениями эндометрия. Согласно полученным данным, нет достаточных оснований считать, что ПНБ и бесплодие даже при наличии АМК являются достоверными клиническими признаками ХЭ.

Микробиологическое исследование проводили последовательно: изучали микрофлору по биотопам влагалища и полости матки (эндометрий).

Таблица 1. Частота различных вариантов вагинального микробиоценоза у обследуемых женщин (в %)

Состояние микробиоценоза	Группы женщин							
	I (n=38)		II (n=92)		III (n=15)		IV (n=19)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Нормоценоз (Н)	15	39,5	50	54,3	8	53,3	12	63,2
Бактериальный вагиноз (БВ)	1	2,6	1	1,1	1	6,7	—	—
Мезоценоз (М)	10	26,3	11	11,9	2	13,3	3	15,8
Аэробный вагинит (АВ)	11	29,0	22	23,9	3	20,0	3	15,8
Кандидозный вагинит (КВ)	1	2,6	3	3,3	1	6,7	1	5,2
АВ+КВ	—	—	4	4,4	—	—	—	—
«Стерильный биотоп»	—	—	1	1,1	—	—	—	—
Вагинальные инфекции (суммарно)	23	60,5	41	44,6	7	46,7	7	36,8

Примечание. АВ+КВ — сочетание аэробного и кандидозного вагинита.

Таблица 2. Состав микроорганизмов, выделенных из биоптата эндометрия у обследуемых женщин

Микроорганизмы	Частота выделения микроорганизмов из биоптата эндометрия по группам							
	I (n=38)		II (n=92)		III (n=15)		IV (n=19)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Энтеробактерии	5	13,2	9	9,8	1	6,7	0	0
Стафилококки	2	5,3	3	3,3	3	20,0	2	10,5
Энтерококки	5	13,2	6	6,5	1	6,7	3	15,8
Стрептококки	9	23,8	14	15,2	4	26,6	5	26,3
Коринебактерии	1	2,6	1	1,1	0	0	0	0
Дрожжевые грибы	0	0	3	3,3	0	0	1	5,2
Актиномицеты	2	5,2	1	1,1	2	13,3	0	0
Облигатные анаэробы	4	10,5	14	15,2	1	6,7	7	36,8
Гарднереллы	6	15,8	9	9,8	0	0	3	15,8
Лактобациллы	12	31,6	43	46,7	6	40,0	6	31,6
Роста нет	8	21,1	10	10,9	4	26,7	1	5,3

Особенности микробиоценоза влагалища представлены в табл. 1.

Из табл. 1 следует, что в группе больных с ПХЭ нормоценоз влагалища наблюдался реже, чем у больных с НХЭ, ПЭ и у женщин с эндометрием в стадии пролиферации (39,5%). Нарушение микробиоценоза влагалища при полной форме ХЭ выявлялось чаще, особенно по сравнению с эндометрием в стадии пролиферации (60,5 и 36,8%, соответственно). При этом доминировали состояния, ассоциированные со строгими анаэробами, гарднереллой (БВ и М) и факультативными анаэробами (АВ), встречавшиеся в 1,8 раз чаще при ПХЭ.

Результаты оценки видового состава УПМ и представителей нормофлоры в биоптатах эндометрия обследованных женщин представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, частота стерильных образцов эндометрия в I—IV группах составила 21,1; 10,9; 26,7 и 5,3%, соответственно. Независимо от морфологического состояния эндометрия нормофлора (лактобациллы) обнаружена в каждом втором—третьем случае. Колонизация эндометрия УПМ в I—IV группах составила: 56,7; 45,1; 40,0 и 50,0% соответственно. При ПХЭ и НХЭ (группы I и II) УПМ, без сопутствующей нормофлоры, высевали в 16,7 и 10,9% случаев, т.е. в 2—3 раза чаще, чем в контрольной группе (5,5%). Однако достоверность межгруппо-

вых различий доказать не удалось, вероятно, из-за малого объема выборок.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при ПХЭ доминировали микроорганизмы факультативно-анаэробного происхождения. Чаще выделяли стрептококки (23,7%), преимущественно *Streptococcus agalactiae* и *S. anginosus*. С одинаковой частотой колонизировали эндометрий энтеробактерии (в основном *Escherichia coli*) и *Enterococcus faecalis* (в 13% случаев). Стафилококки (*S. aureus* и CONS — коагулазонегативные стафилококки) встречались редко (в 5,3% случаев). Существенное место занимала *Gardnerella vaginalis* (15,8%), реже обнаруживали строгие анаэробы и актиномицеты (10,5 и 5,2%, соответственно).

При НХЭ так же, как при ПХЭ, в биоптатах эндометрия доминировали факультативные анаэробы, хотя частота их выделения была ниже: стрептококки (15,2%), энтеробактерии (9,8%), энтерококки (6,5%). Еще реже выделяли *G. vaginalis* (9,8%), строгие анаэробы (7,7%), дрожжевые грибы рода *Candida* (3,3%).

Среди УПМ в группе сравнения, как и в основных группах, чаще высевали стрептококки (26,3%). Однако *S. anginosus* выявляли в 2,5 раза реже, чем при полной форме ХЭ (5,2% против 13,2%). С одинаковой частотой определяли *G. vaginalis* и *E. faecalis* (15,8%). Достоверно чаще, в сравнении с полной формой ХЭ ($p=0,05$), выде-

Таблица 3. Частота колонизации биоплатов эндометрия УПМ у женщин с нормоценозом влагалища и различными вариантами вагинальных инфекций

Группы	Число женщин												
	УПМ (+), n=68						УПМ (-), n=96						
	Н	М	БВ	КВ	АВ	АВ+КВ	Н	М	КВ	АВ	БВ	АВ+КВ	СБ
I (n=38)	1 1 (5,9%)	7	1	1	7	—	14 14 (66,7%)	3	—	4	—	—	—
II (n=92)	10 10 (27,8%)	8	1	1	13	3	40 40 (71,4%)	3	2	9	—	1	1
III (n=15)	3 3 (50%)	1	—	1	1	—	5 5	1	—	2	1	—	—
IV (n=19)	2 2 (22,2%)	3	—	1	3	—	10 10 (100%)	—	—	—	—	—	—
Всего: n=164	16 16 (23,5%)	19	2	4	24	3	69 69 (71,9%)	7	2	15	1	1	1
				52 (76,5%)						26 (27,1%)		1%	

Примечание. Н — нормоценоз; М — мезоценоз; БВ — бактериальный вагиноз; КВ — кандидозный вагинит; АВ — аэробный вагинит; АВ+КВ — аэробный вагинит в сочетании с кандидозным вагинитом; СБ — стерильный биотоп.

ляли CONS (10,5%). В группе сравнения не обнаружены энтеробактерии и актиномицеты.

Видовой состав лактобацилл по группам практически не отличался. Достоверных различий встречаемости лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*) в биоптатах эндометрия не выявлено. Бифидобактерии колонизировали эндометрий в 7,8% и 7,6% случаев при ПХЭ и НХЭ, соответственно, в группе сравнения этот показатель составил 10,4%.

Анализ степени обсемененности эндометрия показал, что в группе сравнения в 100% случаев все УПМ высевали в низком титре (≤ 3 lg КОЕ/мл). Схожие данные получены при ПЭ: 91,7% штаммов УПМ выделены в титре ≤ 3 lg КОЕ/мл. Среди больных с полной и неполной формами ХЭ напротив, в 75,0 и 39,6% случаев, штаммы УПМ выделялись в концентрации 4–6 lg КОЕ/мл гомогената эндометрия. При ПХЭ от 80 до 100% УПМ колонизировали эндометрий в умеренном или высоком титре. Стрептококки, выделенные в высоком титре, относились к двум видам: *S. agalactiae* и *S. anginosus*. При НХЭ высокая обсемененность эндометрия УПМ отмечена в 39,6% случаев. Это почти в 2 раза реже, чем при полной форме ХЭ. Степень обсемененности > 4 lg КОЕ/мл выявлена среди изолятов *G. vaginalis* (55,6%), стрептококков (42,9%), энтеробактерий (44,4%), энтерококка (33,3%) и строгих анаэробов (28,6%).

Актиномицеты обнаруживали редко и только при патологических состояниях эндометрия. Стафилококки и коринебактерии во всех группах высевали лишь в низкой концентрации. Что касается представителей нормофлоры, то в I–IV группах лактобактерии в умеренных титрах высевались с частотой 72,9; 64,7; 56,2 и 65,3%, соответственно.

Частота колонизации образцов эндометрия УПМ у женщин различных групп представлена в табл. 3.

Для установления возможной корреляции между частотой выявления УПМ в эндометрии и состоянием вагинального микробиоценоза сравнили эти показатели у пациенток с нормоценозом и нарушением микрофлоры влагалища. Из 164 обследованных женщин УПМ в биоптате эндометрия обнаружены у 68 (41,5%), у 23,5% — состояние микробиоты влагалища оценено как нормоценоз, у 76,5% — диагностированы различные вагинальные инфекции. Напротив, при отсутствии УПМ в биоптате эндометрия у 71,9% женщин состояние вагинального микробиоценоза соответствовало норме, только у 27,1% выявлены инфекционные нарушения. Сравнение частоты выявления УПМ в эндометрии пациенток с вагинальными инфекциями и нормоценозом показало, что риск колонизации эндометрия при нарушении микрофлоры вагинального биотопа в 3,5 раза выше, чем при нормоценозе ($p < 0,01$, OR=3,5 [95% ДИ 2,2–5,6]). Частота колонизации эндометрия УПМ на фоне вагинальных инфекций у женщин в I–IV группах составила 94,1; 72,2; 50,0 и 77,8%, соответственно. Обращает на себя внимание, что при ПХЭ в 94,1% случаев колонизация эндометрия УПМ сочеталась с нарушением вагинальной микроэкологии. Только у одной пациентки (5,9%) УПМ выявлены на фоне нормоценоза влагалища. Однако у 33,3% пациенток с ХЭ и нарушением вагинального микробиоценоза УПМ в эндометрии обнаружены не были. Относительные риски заселения полости матки УПМ при инфекционной патологии влагалища в сравнении с нормоценозом в I–IV группах соответственно составили: 10,4 [95% ДИ 1,5–70,6]; 3,8 [95% ДИ 2,0–7,0]; 1,2 [95% ДИ 0,3–3,9] и 5,9 [95% ДИ 1,6–21,2]. Максимальный относительный риск восходящей инфекции отмечен у женщин с ХЭ при нарушении микробиоценоза влагалища. При анализе вариантов вагинальных инфекций, с которыми чаще ассоциируется ко-

лонизация эндометрия УПМ, установлена их связь преимущественно с М, БВ и АВ.

Обсуждение результатов

Клинические симптомы ХЭ неспецифичны и характерны для многих заболеваний органов малого таза [9, 10]. Согласно экспертному мнению American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), изложенному в рекомендациях по ведению больных ХЭ (2015 г.), он выявляется у 20–40% женщин с бесплодием и приблизительно у 30% с неудачами переноса эмбрионов в программе ЭКО [11]. По полученным нами данным, бесплодие у пациенток с ХЭ и ПЭ встречалось с одинаковой частотой — в 60–80% случаев. Причём, у каждой четвёртой пациентки с ХЭ попытки проведения программы ЭКО заканчивались неудачами. ПНБ было отмечено почти у каждой десятой пациентки с ХЭ и ни в одном случае среди пациенток с ПЭ. Результаты проведённого исследования показали, что АМК в виде ОМК и ММК характерны для каждой второй пациентки с ХЭ, независимо от его формы, в группе сравнения они встречались в 2 раза реже. Нарушения менструального цикла по типу ММК встречались во всех группах с равной частотой, ОМК чаще регистрировали в группе пациенток с ПЭ ($p=0,013$). Таким образом, АМК могут манифестировать различные морфоструктурные нарушения эндометрия, как воспалительные, так и пролиферативные. Поэтому диагностика ХЭ не может основываться только на клинических данных, а должна включать морфологическое исследование и определение микробного пейзажа эндометрия.

Согласно данным литературы, у пациенток репродуктивного возраста в 60% случаев ХЭ сочетается с ПЭ, в 52,7% случаев отмечается колонизация эндометрия микрофлорой [12]. Хронический воспалительный процесс в слизистой оболочке матки усиливает межклеточные и стромально-паренхиматозные нарушения, что приводит к активации неоангиогенеза, пролиферации клеток эндометрия. Эти процессы предположительно составляют патогенетическую основу для формирования ПЭ [13]. По мнению некоторых авторов, морфофункциональные изменения при ХЭ могут предшествовать формированию полипов эндометрия [11].

До настоящего времени не сформирована единая концепция патогенеза ХЭ, на основе которой можно было бы чётко представить все этапы хронизации процесса. Для современных женщин свойственна высокая частота патологической колонизации микроорганизмами нижних отделов полового тракта. Это, по-видимому, является основным источником инфицирования слизистой оболочки полости матки [14]. Ежемесячное циклическое отторжение эндометрия рассматривает-

ся в качестве одного из механизмов физиологической защиты от колонизации микроорганизмами верхнего отдела полового тракта. Однако данный механизм не всегда оказывается достаточным для осуществления самоэлиминации патогенов [1].

Данные литературы о частоте выявления различных возбудителей в эндометрии больных ХЭ весьма противоречивы. Дискуссионным является вопрос о роли УПМ и абсолютных патогенов в генезе ХЭ. Есть точка зрения, что пусковым механизмом развития воспалительного процесса в эндометрии может быть колонизация УПМ, которая при морфологически верифицированном ХЭ определяется в 58–78% случаев [14]. Согласно рекомендациям ACOG (2015), уреоплазма, наравне с абсолютными патогенами, рассматривается как возбудитель ХЭ. Однако в литературе представлены и другие данные: присутствие УПМ в полости матки не всегда свидетельствует об их этиологической роли при ХЭ. По мнению ряда исследователей, слизистая оболочка матки не может быть стерильной, так как непрерывно подвергается риску восходящего инфицирования из нижних отделов полового тракта. Эту точку зрения подтверждает исследование микробиома полости матки у женщин с меноррагиями и дисменореями, проведённое E. S. Pelzer и соавт. [15], которые показали, что в 50% образцов эндометрия при отсутствии признаков воспаления, обнаруживались *Lactobacillus* spp., а у нерожавших женщин наиболее распространёнными УПМ были *Prevotella*, *Fusobacterium* и *Jonquetella*.

Одна из задач настоящего исследования была посвящена уточнению роли УПМ в этиологии ХЭ и ПЭ. В группе женщин с ПХЭ нарушение вагинального микроценоза наблюдалось в 1,6 раза чаще, чем в образцах эндометрия в стадии пролиферации. Наиболее часто ПХЭ ассоциировалась с вагинальными инфекциями, обусловленными УПМ. При ПХЭ почти в 2 раза чаще диагностировали БВ, М и АВ. Полученные результаты согласуются с данными зарубежной литературы [9, 14]. Так, по мнению экспертов ACOG, при I–II степени частоты влагалищных мазков риск развития ХЭ составляет всего 5% [16].

Согласно полученным данным, выявление УПМ в эндометрии больных ПХЭ составило 56,7%. Среди них заметное место занимали стрептококки (23,7%), *G.vaginalis* (15,8%), энтеробактерии и *E.faecalis* (по 13%). В 16,7% случаев в эндометрии были выделены только УПМ. От 80 до 100% УПМ колонизировали эндометрий в высоком титре. Это даёт основание относить их к вероятным этиологическим агентам воспаления.

При полной форме ХЭ частота стерильных посевов эндометрия составила 21,1%, в 43,3% случаев, выделены только представители нормофлоры. Можно предположить, что у части пациенток воз-

будителями ХЭ могли быть патогены, не рассмотренные в настоящем исследовании. Возможна роль генитальных микоплазм, хламидий, вирусов и прочих микроорганизмов. Этот вывод согласуется с результатами исследования Cicinelli E. и соавт., в котором при гистологически подтвержденном ХЭ в эндометрии были выделены *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* (25,3%), *Chlamydia trachomatis* (12,7%) [2].

При НХЭ частота стерильных образцов эндометрия составила 10,9%, что в 2 раза реже, чем при полной форме. УПМ выявляли в 45,1% случаев. Среди них, как и при полной форме ХЭ, ведущими были факультативные анаэробы: стрептококки (15,2%), энтеробактерии (9,8%), *Enterococcus faecalis* (6,5%), дрожжевые грибы (3,3%). Реже выделялись *G.vaginalis* (9,8%) и строгие анаэробы (7,7%). Однако в этой группе высокая степень обсеменённости эндометрия УПМ отмечена у 39,6% изолятов, что почти в 2 раза реже, чем при полной форме ХЭ. Схожие данные представлены другими авторами. Так, Cicinelli E. и соавт. при ХЭ обнаружили стрептококки у 26% женщин (в том числе *S.agalactiae* — у 14%); *E.faecalis* и *E.coli* суммарно — у 31% [2]. Andrews W. и соавт. [9] установлена взаимосвязь между БВ и частотой колонизации эндометрия БВ-ассоциированными микроорганизмами [17].

В последнее время появились сообщения о формировании структурированных биопленок на клетках эндометрия бактериями, вызывающими БВ. Так, Swidsinski A. и соавт., исследовав образцы эндометрия и фаллопиевых труб после гистерэктомии, показали, что у женщин с БВ риск образования биопленки *G.vaginalis* на поверхности эндометрия и фаллопиевых труб составил 50,0%. Авторы сделали предположение, что «хранение» УПМ в биопленках может быть важным факто-

ром развития ХЭ [18]. Можно полагать, что *G.vaginalis*, выделенная в настоящем исследовании в высоком титре (в 83,3% случаев при полной форме ХЭ и в 55,6% — при неполной), играет существенную роль в этиологии разных форм ХЭ. Это заключение представляется важным для разработки лечебной тактики и подбора адекватной антибактериальной терапии.

Сравнение частоты выявления УПМ в эндометрии женщин с вагинальными инфекциями и нормоценозом показало, что риск колонизации эндометрия при нарушении микроэкологии влагалища в 3,5 раза выше, чем у пациенток с нормоценозом ($p < 0,01$, ОР=3,5 [95% ДИ 1,63—8,11]). Более высокий риск восходящей инфекции отмечен при ХЭ.

Таким образом, проведение микробиологического исследования нужно рассматривать как компонент комплексной диагностики, необходимый для выбора адекватной тактики ведения больных с ХЭ и ПЭ. Точность идентификации возбудителя и оценка чувствительности его к антибактериальным препаратам определяют эффективность этиотропной терапии. Неадекватное назначение противомикробных средств может приводить к патологическим изменениям микробиоценоза различных отделов полового тракта и трансформации заболевания в латентную форму.

Работа выполнена в рамках соглашения Минобрнауки России № 14.607.21.0019 от 05.06.2014 «Разработка молекулярно-генетических тест-систем для оценки патогенности и резистентности возбудителей нозокомиальных и оппортунистических инфекций у матери и новорождённого» (шифр 2014-14-579-0001-065).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шуришалина А.В. Роль хронического эндометрита в развитии патологии репродуктивной функции. Росс мед журн 2007; 4: 25—27. / Shurshalina A.V. Rol' hronicheskogo jendometrita v razvitii patologii reproduktivnoj funkcii. Ross med zhurn 2007; 4: 25—27. [in Russian]
2. Cicinelli E., Mateo M., Tinelli R., Lepera A., Alfonso R., Indraccolo U., Marroccella S., Greco P., Resta L. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. Hum Reprod 2014 Nov 10. pii: deu292.
3. Johnston-MacAnanny E.B., Hartnett J., Engmann L.L., Nulsen J.C., Sanders M.M., Benadiva C.A. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after *in vitro* fertilization. Fertil Steril 2010; 93: 2: 437—441.
4. McQueen D.B., Bernardi L.A., Stephenson M.D. Chronic endometritis in women with recurrent early pregnancy loss and/or fetal demise. Fertil Steril. 2014 Apr; 101: 4: 1026—1030.
5. Carvalho F.M., Aguiar F.N., Tomioka R., Oliveira R.M., Frantz N., Ueno J. Functional endometrial polyps in infertile asymptomatic patients: a possible evolution of vascular changes secondary to endometritis. Eur J Obst Gynecol Reprod Biol 2013; 170: 152—156.
6. Ju J., Li L., Xie J., Wu Y., Wu X., Li W. Toll-like receptor-4 pathway is required for the pathogenesis of human chronic endometritis. Exp Ther Med 2014 Dec; 8: 6: 1896—1900.
7. Matteo M., Cicinelli E., Greco P., Massenzio F., Baldini D., Falagario T. et al. Abnormal pattern of lymphocyte subpopulations in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. Am J Reprod Immunol 2009; 61: 5: 322—329.
8. Анкирская А.С., Муравьева В.В. Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов (медицинская технология). М.: 2011; 10—13. / Ankirskaja A.S., Murav'eva V.V. Integral'naja ocenka sostojanija mikrobioty vlagalishha. Diagnostika opportunisticheskikh vaginitov (medicinskaja tehnologija). M.: 2011; 10—13. [in Russian]
9. Andrews W.W., Hauth J.C., Cliver S.P., Conner M.G., Goldenberg R.L., Goepfert A.R. Association of asymptomatic bacterial vaginosis with endometrial microbial colonization and plasma cell endometritis in non-pregnant women. Am J Obstet Gynecol 2006; 195: 6: 1611—1616.
10. Polissen F., Bambirra E.A., Camargos A.F. Detection of chronic endometritis by diagnostic hysteroscopy in asymptomatic infertile patients. Gynecol Obstet Invest 2003; 55: 4: 205—210.
11. Rivlin M.E. Endometritis treatment and management. Jan. 2015. Overview. www.Medscape.com
12. Клинышкова Т.В., Фролова Н.Б., Мозговой С.И. Клиническое значение комплексной оценки рецепторного статуса эндометрия при эндометриальных полипах. Журн акушер гинекол 2003; 3. / Klinyschkova T.V., Frolova N.B., Mozgovoj S.I. Klinicheskoe znachenie kompleksnoj ocenki receptornogo statusa jendometrija pri jendometrial'nyh polipah. Zhurn akusher ginekolog 2003; 3. [in Russian]
13. Шешукова Н.А., Макаров И.О., Овсянникова Т.В. Гиперпластические процессы эндометрия: особенности пролиферативной активности при сочетании с хроническим эндометритом. Акушер гинекол репрод 2011; 3: 10—15. / Sheshukova N.A., Makarov I.O., Ovsjannikova T.V. Giperplasticheskie processy jendometrija: osobennosti proliferativnoj aktivnosti pri sochetanii s hronicheskim jendometritom. Akusher ginekolog reprod 2011; 3: 10—15. [in Russian]

14. Haggerty C.L., Hillier S.L., Bass D.C., Ness R.B.; PID Evaluation and Clinical Health study investigators. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. Clin Infect Dis 2004; 39: 7: 990—995.
15. Pelzer E.S., Dana L.W., Buttini M., Huygens F. A role for the endometrial microbiome in dysfunctional menstrual bleeding. <http://esa-srb-2013.m.asnevents.com.au/schedule/abstract/7389>.
16. Rivlin M.E., Former M.D. Endometritis Treatment & Management. 2015. www.medscape.com.
17. Andrews W.W., Goldenberg R.L., Hauth J.C., Cliver S.P., Copper R., Conner M. Interconceptional antibiotics to prevent spontaneous preterm birth: a randomized clinical trial. Am J Obstet Gynecol 2006; 194: 3: 617—623.
18. Swidsinski A.I., Verstraeten H., Loening-Baucke V., Swidsinski S., Mendling W., Halwani Z. Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. PLoS One. 2013; 8: 1: e53997.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Марченко Л. А. — д.м.н., профессор, отделение гинекологической эндокринологии, ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

Чернуха Г. Е. — д.м.н., профессор, отделение гинекологической эндокринологии, ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

Якушевская О. В. — к.м.н., н.с., отделение гинекологической эндокринологии, ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

Гомболевская Н. А. — аспирант, отделение гинекологической эндокринологии, ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

Муравьева В. В. — к.б.н., отделение микробиологической и клинической фармакологии, ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

Припутневич Т. В. — д.м.н., отделение микробиологической и клинической фармакологии, ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

Ан кирская А. С. — д.м.н., профессор, отделение микробиологической и клинической фармакологии, ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

Вторичные метаболиты морских микроорганизмов.

II. Морские грибы и места их обитания

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

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

Secondary Metabolites from Marine Microorganisms. II. Marine Fungi and Their Habitats

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

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Морские грибы представляют большой интерес, как новый многообещающий источник биологически активных веществ — противоопухолевых соединений, антибиотиков, ингибиторов биохимических процессов. Поскольку морские организмы обитают в биологически конкурентной среде с уникальными условиями, вторичные метаболиты морских грибов отличаются значительным многообразием. Последние исследования в области генома показали, что грибы могут быть носителями генных кластеров, кодирующих образование ранее неизвестных вторичных метаболитов. Активизация таких ослабленных или спящих генов может быть использована как для повышения активности известных соединений, так и для выделения новых веществ.

Ключевые слова: морские грибы, биоактивные вторичные метаболиты, активизация спящих генов биосинтеза, глубоководные гидротермальные выбросы (чёрные курильщики), солеустойчивые грибы, экстримофильные грибы.

Marine-derived fungi are of great interest as a new promising source of biologically active products such as anticancer compounds, antibiotics, inhibitors of biochemical processes. Since marine organisms inhabit biologically competitive environment with unique conditions, the chemical diversity of the secondary metabolites from marine fungi is considerably high. Recent genomic studies demonstrated that fungi can carry gene clusters encoding production of previously unknown secondary metabolites. Activation of the attenuated or silent genes would be useful either for improving activities of the known compounds or for discovery of new products.

Key words: marine fungi, bioactive secondary metabolites, activation of silent biosynthetic genes, deep-sea hydrothermal vents, halo-tolerant fungi, extremophilic fungi.

Последние пять-семь лет отмечены публикациями о биологически активных природных продуктах из морских организмов (губки, асцидии, звёзды), водорослей и морских микроорганизмов (бактерии, актиномицеты, грибы). Многие из них образуют соединения разных типов: липополисахариды, липиды, поликетиды, пептиды, циклопептиды, гетероциклы, алкалоиды, терпеноиды и другие чрезвычайно важные для медицины соединения. Это могут быть противоопухолевые и противовоспалительные вещества, антибиотики, активные против микроорганизмов с множественной устойчивостью, ингибиторы метаболитических процессов [1–6].

Морские микроорганизмы являются важным и неисчерпаемым источником вторичных метаболитов как основы для получения лекарственных препаратов. Один из важнейших источников активных природных продуктов — морские грибы.

Процесс изоляции морских микроорганизмов и их культивирование требуют систематических исследований в каждом случае. 99% микроорганизмов из отобранной пробы не образуют колоний на традиционных средах, возможно из-за отсутствия специфических питательных веществ и других факторов (сигнальных молекул, электронных доноров и акцепторов, экстрактов губок). Методы выделения и культивирования морских грибов, ассоциированных с различными морскими организмами (губки, звёзды, водоросли, кораллы и др.), детально описаны в работе [7]. Изоляты морских грибов далее культивируются для выявления биосинтеза ими новых веществ, обладающих определёнными биологическими свойствами.

У выделенных культур можно идентифицировать кластеры биосинтетических генов конкретных метаболитов. При комбинировании данных гомологической базы и филогенетического анализа скрининг генов даёт возможность быстро определить тип структуры нового метаболита [8].

В настоящем обзоре представлены достаточные новые (2007–2015/16 гг.) данные о морских грибах как продуцентах новых вторичных метаболитов.

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 119234 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. Биологический факультет МГУ

тов: места их обитания, ассоциация с другими морскими организмами, особенности культивирования, химическая структура и биологическая активность новых метаболитов. Особое внимание уделяется цитотоксическим свойствам и антимикробной активности в отношении клинических изолятов, устойчивых к антибиотикам.

1. Активация «молчащих» генов

Биосинтетический потенциал морских микроорганизмов, в частности, грибов, значительно больше, чем тот объём соединений, которые уже обнаружены и выделены. Многие микробные кластеры биосинтетических генов не проявляются в лабораторных условиях и остаются «молчащими», в состоянии репрессии. Предложен ряд стратегий для их активации, основанных на создании тем или иным способом стрессовой ситуации. Доминирующий тип репрессии — положительная регуляция трансляционных белков. Члены семейства белков-регуляторов LysR, обладающие активностью «угнетение», являются мишенью действия для снятия этой регуляции. Удаление или дезактивация супрессорных белков даёт шанс освободить «молчащие» гены и активировать их [9].

Химический мутагенез как один из методов создания стресса также был использован для активации «молчащих» генов. Морской гриб *Penicillium purpurogenum* подвергали действию диэтилсульфата, полученный мутант G59 образовывал три новых и два известных C25 стероидов необычной структуры. Вещества не синтезировались до обработки микроорганизма мутагеном, т.е. идентифицированные стероиды являются продуктами активированных мутагенезом генов. Все эти стероиды цитотоксичны против ряда линий раковых клеток [10].

Споры глубоководного гриба *Aspergillus versicolor* ZBY-3 не образующего активных веществ, обрабатывали ультразвуком в различных режимах в присутствии высокой концентрации неомицина. Ультразвук увеличивал поступление в клетку экзогенного неомицина. Получено 30 устойчивых к неомицину штаммов, 22 мутанта ингибировали рост клеток рака человека K562. Видимо, возникновение устойчивости в условиях стресса, активировало «молчащие» гены. Показан синтез четырёх циклодипептидов (дикетопиперазинов) и двух соединений другого типа [11].

Известно, что кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов расположены в дистальных отделах хромосом, находящихся в виде гетерохроматина, для экспрессии которого возможен эпигенетический контроль. Это даёт возможность с помощью эпигенетических модификаторов воздействовать на «молчащие» гены. У морского гриба *Leucostoma persoonii* — продуцента

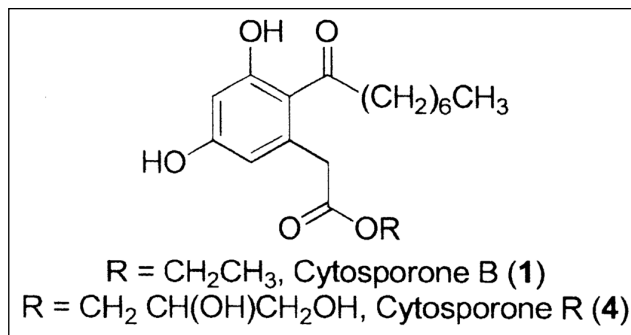


Рис. 1. Цитоспороны [12]

антибиотиков цитоспоронов В, С, Е и R (рис. 1) при выращивании в присутствии эпигенетических модификаторов (гистендеацетилаза, ДНК-метилтрансфераза, бутират натрия, 5-аза-цитидин) синтез цитоспоронов увеличивался в 3—8 раз по сравнению с культурой, растущей в лабораторных условиях без модификаторов. Цитоспороны Е активен против малярийного плазмодия, цитотоксичен в отношении линии клеток A549 [12].

Активация «молчащих» генов может произойти в результате так называемого абиотического стресса, например, при воздействии солей металлов. Клаватустиды В и С синтезируются морским штаммом *A. clavatus* C2WU, выделенным из краба, обитающего вблизи гидротермального источника (Тайвань), воды которого богаты соединениями серы и солями металлов, в частности, цинка. Клаватустиды представляют собой циклодипептиды, содержащие, кроме аминокислот, димер антраниловой кислоты, ранее не обнаруживаемый в природных продуктах. Клаватустиды получают, культивируя аспергилл на среде с солями цинка. Вещества оказывают сильное цитотоксическое действие в отношении различных линий раковых клеток. Механизм их действия состоит в блокировке перехода G₁-S клеточного цикла, индуцируемой клаватустидами. Клаватустид В предположительно может быть использован как препарат для лечения химио- и радиоустойчивых видов рака [13, 14].

Pestalotiopsis sp. Z233, выделенный из морской водоросли, культивировали на среде, содержащей абиотический стресс-агент CuCl₂. В этих условиях образовывались два дополнительных соединения, идентифицированные как сесквитерпены, обладающие активностью ингибитора тирозиназы, сравнимой по величине с активностью эталонного ингибитора тирозиназы. Содержащий медь многофункциональный фермент тирозиназа используется в клинике при лечении дерматологических заболеваний, связанных с меланингиперпигментацией [15].

Индукция включения «молчащих» генов в ряде случаев может быть вызвана совместным куль-

тивированием пар микроорганизмов: гриб—гриб, гриб—бактерия, бактерия—бактерия. Появляющиеся при этом антагонизм и конкуренция между микроорганизмами ведут к увеличению выхода первоначальной продукции или к накоплению новых соединений, которые не обнаруживаются в чистой культуре продуцента из-за их ничтожного содержания. Это явление представляет собой результат стресса, вызванного конкурентным микроорганизмом и, видимо, является частью химической защиты и ингибирования антагониста [16]. При совместном культивировании эндофитного гриба *Fusarium tricinctum* и *Bacillus subtilis* на плотной рисовой среде в 78 раз увеличивается накопление вторичных метаболитов (латеропирон, энниатины, липопептид фузаристатин и три новых продукта-макрокарпон С, 2-(карбоксиметиламино)-бензойная кислота, цитриокумаринол). Латеропирон ингибировал рост большого числа бактерий при 2—8 мкг/мл, энниатины подавляли рост *B. subtilis* при 8—16 мкг/мл [17].

Морской гриб *Emericella* sp. при совместном культивировании с морским штаммом стрептомицета *Salinospora arenicola* синтезирует новые циклодепептиды эмерицелламиды А и В, в состав которых входит 3-гидрокси-2,4-диметилдекановая и 3-гидрокси-2,4,6-триметилдодекановая кислоты. Соединения активны против метициллиноустойчивых стафилококков [18].

Стрессовая ситуация может быть создана варьированием состава ферментационной среды и условий культивирования: источники углерода и других компонентов, плотная или жидкая среда, аэрация, температура выращивания и др. При разных вариантах культивирования образуются разные метаболиты согласно принципу: один штамм — много соединений.

Морской гриб *Ascotricha* sp. ZJ-M-5 на автотрофной среде синтезирует аналоги циклонерадиола, 3,4-ланостан тритерпеноид и дикетопиперазин. На олиготрофной среде Чапека образуются три новых производных кариофиллена и известные 1,3,6-тригидрокси-8-метилксантон и деметилпесталотиопсины А и С, которые ингибируют рост клеток рака легких [19].

Морской гриб *P. adametzoides* AS-53 на картофельном декстрозном бульоне образует два новых производных бис-тиодикетопиперазинов адаметизины А и В. На плотной рисовой среде образуются два новых сесквитерпена адаметкеролы А и В. Все соединения активны против бактерий, но очень токсичны [20].

Штамм *Neosartorya pseudofishery*, выделенный из морской звезды, на среде с глицерином, пептоном и дрожжевым экстрактом синтезирует два новых дикетопиперазина неосартины А и В вместе с двумя известными родственными дикетопиперазинами. При замещении в среде глицерина

глюкозой состав метаболитов значительно изменяется, появляются новый глиотоксиновый алкалоид — меротерпеноид и другие производные глиотоксина [21].

2. Морские грибы в ассоциациях с кораллами

Сложные микробные взаимоотношения чрезвычайно важны для многих экосистем, особенно для экосистем с участием кораллов. Однако о роли микроорганизмов в таких экосистемах известно мало.

Изучение разнообразия симбиотических грибов, связанных с кораллом *Echinogorgia rebekka* из рифа Weizhou Южнокитайского моря, привело к выделению 18 штаммов, принадлежащих к группе *Ascomycota* (7 родов, относящихся к 5 порядкам). Большую часть изолятов составляли представители *Penicillium*, *Aspergillus* и *Cladosporium*. Все штаммы показали тот или иной уровень антибиотической активности. Большинство изолятов было активно против патогенных стафилококков и *Micrococcus tetragenus* [22].

Ассоциированный с кораллом *Penicillium* sp. SCSGAF0023 синтезировал два новых поликетиды — 6,8,5',6'-тетрагидрокси-3-метилфлаван и пенилин С, а также шесть аналогов секалоновой кислоты. Эти аналоги и пенилин С активны против патогенных бактерий и личинок *Balanus amphitrite* [23].

При культивировании гриба *Cladosporium* sp. получен новый бициклический лактам кладоспорилактамы (7-окса-бицикло-[6,3,0]-лактам) — первый пример бициклического лактама из природных источников (рис. 2). Выделено также шесть известных 12-членных макролидов, некоторые из них активны против ряда патогенных бактерий, одно вещество — против различных линий раковых клеток [24].

P. pinophilum XS-20090E18 синтезирует производные азафилонина пинофилины и новый дифениловый эфир гидроксипеницилид. Некоторые соединения в нетоксичных концентрациях ингибируют рост личинок *Balanus amphitrite* и прояв-

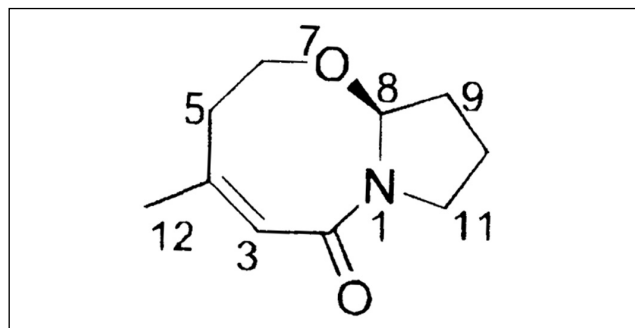


Рис. 2. Кладоспорилактамы [24]

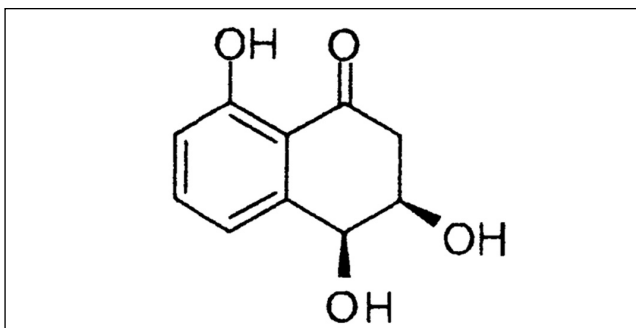


Рис. 3. Поликетид [28]

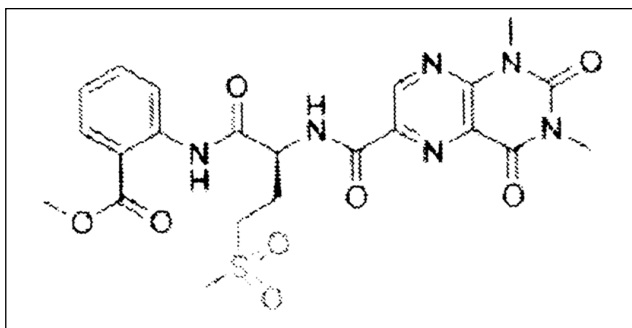


Рис. 4. Лумазиламид [29]

ляют цитотоксичность в отношении линий клеток Нер-2, RD и Hela [25].

Два новых пренилированных дигидрохинолоновых производных VI и VII и два известных аналога — α -хинолоны A(3) и D были выделены из мицелия *Aspergillus* sp. XS-20090B15 — симбионта коралла. Пренилированный участок молекул VI и VII ацилирован N-метилвалином. Соединение VII имеет очень высокую (IC_{50} 42 нМ) активность против респираторного вируса RSV — в 500 раз эффективнее контрольного препарата рибаверина [26].

Шесть стероидных производных (1—6) и пять производных бутиролактона (7—11) были выделены из ферментативной среды штамма *Aspergillus* sp., извлечённого из кораллового рифа. Соединение I — новый высококонъюгированный стероид и некоторые другие из полученных веществ ингибируют рост личинок *B.amphitrite*, два соединения проявляют высокую антибиотическую активность против *S.aureus* [27].

Грибной штамм *Xylariaceae* sp. SCSGAF 0086, выделенный с поверхности кораллового рифа, образует 18 поликетидов (рис. 3), включая цитринины, производные фенола, циклопентенон, тетралоны и нафталиновые производные, однако никакой биологической активности у соединений обнаружить не удалось [28].

Четыре лумазиновых пептида — пенилумамида, в том числе три новых, а также новый циклопептид асперпептид A получены из *Aspergillus* XS-20090B15, выделенного из кораллового рифа. Новые лумазиновые пептиды — редкие соединения (рис. 4) [29].

Грибы из мягких кораллов

Sarcophyton tortuosum — наиболее обильный мягкий коралл, обитающий на мелководье Южно-Китайского моря. Из этих кораллов было выделено много разнообразных терпеноидов, однако в последние годы интерес переключился на микроорганизмы, находящиеся в симбиозе с кораллами.

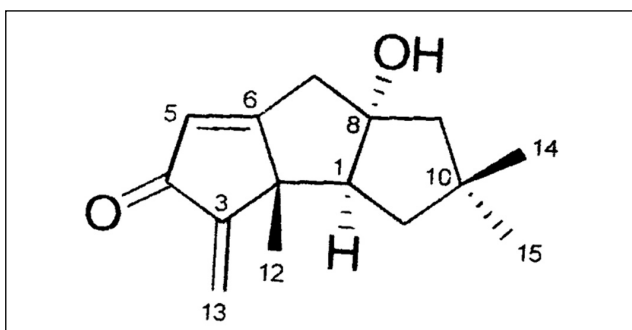


Рис. 5. Хондростерин [30]

Из мягкого коралла выделен гриб *Chondrostereum* sp., при культивировании которого на декстрозной среде было получено пять новых триквинан-сесквитерпеноидов — хондростерины A-E (рис. 5) и известный сесквитерпеноид хирсутанол. Препарат A имеет значительную цитотоксическую активность против линий клеток рака A549, CNE2 и LoVo (IC_{50} 2,45, 4,95 и 5,47 мкМ, соответственно), остальные препараты не обладают биологической активностью [30]. Синтезируемый этим грибом ранее описанный инкарнал был цитотоксичен против различных линий раковых клеток. Цитотоксичность препарата A и инкарнала объясняют наличием в их структурах фрагмента α -метилкетона [31].

Выделенный из мягкого коралла гриб *Lophiostoma* образует новый меросесквитерпеноид кратереллин D, ранее известные кратереллин A2 и пять 10-членных макролидов. Кратереллины обнаруживают антибактериальную активность против *B.cereus* (МИК 3,12 мкМ) [32].

Два новых поликетидов кладоспиды E и F вместе с известным изокладоспидом были получены при культивировании *Cladosporium* sp. TZP-29, выделенного из мягкого коралла. Компонент E является мощным продуцентом липолипидемической НерG2 гепатоцитов [33].

Морской гриб *Alternaria* sp. ZJ-2008003, выделенный из внутренних тканей мягкого коралла, образует пять новых производных антрахинона и пять новых антраноидных димеров альтерпорриолов. Некоторые из соединений активны против

вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома [34].

Четыре новых поликетиды синтезируются грибом *Paecilomyces variotii*, выделенным из медузы. Полученные соединения были активны против патогенных бактерий, включая устойчивый к метициллину *S.aureus* 3089 и обладающий множественной устойчивостью *Vibrio parahemolyticus* 7001 (МИК 5—40 мкг/мл) [35]. Из этого же гриба были изолированы производные спирокеталей — паецилокетали. Одно из соединений активно против морского патогена *Vibrio ichthyenteri* [36].

Особенностью вторичных метаболитов, выделенных из обитающих в кораллах (рифы и мягкие кораллы) грибов, является их ингибирующее действие на морские грамположительные патогены, а также на бактерии с устойчивостью к метициллину и с множественной устойчивостью. Кроме того, эти соединения токсичны для личинок *B.amphitrite*, что снижает обрастание предметов в морской воде. Соединения относятся к различным группам химических веществ. Грибы из рифов и мягких кораллов принадлежат к разным родам.

3. Грибы, выделенные с больших глубин из гидротермальных источников

Геологическое окружение и геохимическая природа гидротермальных глубоководных источников привлекают различные микроорганизмы, благодаря которым идут процессы хемосинтеза, формируется метаболитическое разнообразие, в том числе вторичных метаболитов. Гидротермальные источники очень важны как «горячие пятна», дающие обширный материал для исследования обитающих там микроорганизмов и образуемых ими природных продуктов [37, 38].

Гриб *Aspergillus* sp. 16-021 был выделен из глубинных осадков вблизи гидротермального источника Lau Basin на юго-западе Тихого океана (t° 114 $^{\circ}$ C). При культивировании на жидкой среде гриб синтезировал только ранее известные метаболиты, на плотной среде получено девять новых компонентов и пять известных. Новые соединения являются поликетидами и происходят из β -ненасыщенного γ -лактона или ненасыщенного δ -лактона. Все полученные поликетиды ингибируют в различной степени раковые клетки человека K562, HL-60, BGC-823, HeLa [39].

Гриб *A.terreus*, выделенный из горячей зоны источника (Тайвань) синтезирует два новых меротерпеноида. Ферментация проводится при 40 $^{\circ}$. Предполагается, что биосинтез этих веществ определяется взаимодействием сесквитерпена с фенил- α -пироном. Одно из соединений ингибирует экспрессию циклооксигеназы-2 в LPS-стимулированных макрофагах [40].

A.clavatus C2WU, выделенный из краба, обитающего в экстремальных токсических условиях вблизи гидротермальных источников (Тайвань), в лабораторных условиях синтезирует два новых циклодепептида — клаватустиды А и В. Клаватустиды представляют собой циклодепептиды, содержащие остатки D-фенил-молочной кислоты и димер антраниловой кислоты, ранее не обнаруживаемый в природных продуктах. Циклопептиды такого состава очень редки в природных продуктах, однако димеры антраниловой кислоты используются в медицинской химии. Циклопептиды А и В угнетают пролиферацию в гепатоклеточной карциноме, клеточных линиях HepG2, SMMC-7721, BeL-7402 [13].

Тот же микроорганизм, также выделенный из краба, при культивировании в присутствии солей цинка, синтезирует новый циклопептид клаватустид С вместе с уже известным клаватустидом В. Клаватустид С цитотоксичен против целого ряда клеточных линий рака человека [14].

Из донного осадка с глубины 5115 м выделен *Penicillium* sp., образующий при культивировании на плотной среде три новых биоактивных спиродинтерпеноида — бревионы. Вещества обладают значительной цитотоксичностью против клеток MCF-7 [41].

Зоны вокруг гидротермальных источников, видимо, предпочтительны для представителей рода *Aspergillus*.

Грибы из зон с низкими температурами

Trichoderma sp. MF-106 — гриб из Гренландского моря синтезирует два новых пиридоны — триходины А и В и известное соединение пиридоксантины. Триходины, возможно, образовались в результате межмолекулярной циклизации пиридинового основания и фенильной группы. Триходин А и пиридоксантины активны против клинических изолятов *S.epidermidis* с IC₅₀ 24 и 4 мкМ, соответственно [42].

Pseudogymnoascus sp. — морской гриб из антарктической губки образует четыре производных нитроастерриновой кислоты. Эти вещества — первые нитропроизводные известного метаболита грибов астерриновой кислоты. Новые соединения не проявляют активности против бактерий и грибов [43].

Penicillium sp. PR19 N-I выделен с глубины 1000 м антарктического океана, из зоны с экстремально неблагоприятными условиями существования. Гриб образует четыре новых хлорсодержащих эремофилов сесквитерпена (рис. 6), в основе структуры которых декалиновый цикл. Одно из соединений представляет собой 1-хлор-3- β -ацетокси-7-гидрокси-тринорэремофилов-6-9-триен-8-ОН, вещество цитотоксично против двух клеточных линий рака человека [44].

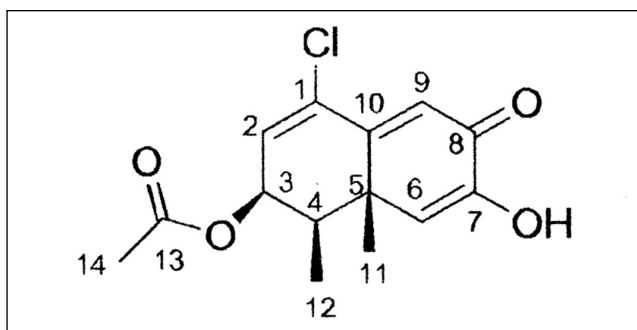


Рис. 6. Эремофилан сесквитерпен [44]

Penicillium sp. K3620, выделенный из вод Северного моря, синтезирует четыре новых ароматических эутироида, являющихся ингибиторами активности гликогенсинтазы киназы [45].

Морские грибы из крайне экстремальных условий обитания (низкие температуры) сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов, обладающих биологической активностью. Это отмечено и для грибов, выделенных из почв Антарктиды и Арктики.

Охрацеопоны А-Е — новые высоко оксегенированные α -пирон меросесквитерпеноиды вместе с новым изомером астелтоксина — изоастелтоксином и рядом известных метаболитов были получены при культивировании гриба *A.ochraceopetaliformis* SCSIO 05702, выделенного из почв Антарктиды. Охрацеопоны А-Д являются первым примером α -пирон меросесквитерпеноида с линейным тетрациклическим углеродным скелетом. Компонент А и изоастелтоксин активны против вирусов гриппа H1N1 и H3N2 [46].

Два новых дитерпена — либертелленоны G и H были выделены из гриба *Eutypella* sp. D-1, изолированного из почвы высоких широт Арктики. Компонент H активен против семи линий опухолевых клеток, IC₅₀ между 0,31 и 44,1 мкМ [47].

Грибы из Berkeley Pit Lake

Berkeley Pit Lake (Монтана) — заброшенный медный рудник глубиной в 540 м, содержащий 1140 млн л отработанной кислотной воды с растворёнными в ней сернокислыми солями металлов. Из воды этого «озера» с глубины 270 м было выделено несколько штаммов экстремофильных грибов, способных синтезировать метаболиты, некоторые из которых обладали биологической активностью.

Три меротерпена — беркелидион, беркелитрион и беркелиацетали А-С были получены при культивировании штамма *Penicillium* sp. [48]. Несколько новых биологически активных гибридных поликетид-терпеноидов и новых беркелиамидов синтезировала культура *P.rubrum* [49]. Выделен-

ный штамм *P.solitum* образовывал драймен-сесквитерпеноиды беркелидраймены А и В. Эти вещества ингибируют сигнал трансдукции ферментов каспазы-1 и каспазы-3, что снижает образование интерлейкина 1- β в индуцированных клетках клеточной линии про-моноцитной лейкемии [50].

Из культуральной жидкости *P.rubrum* выделены новые берказафилоны, производные беркедиеновой кислоты, беркединолактон, а также описанные ранее азафилон, вермистатин, дигидровермистатин. Берказафилоны активны против некоторых клеточных линий лейкемии [51].

Экстремофильный штамм *Pleurostomophora* на жидкой среде образует беркхетоазафилоны А-С и красный пигмент беркхеторубрамин. Беркхетофилон В ингибирует биосинтез интерлейкинов-1 β и -6, TNF- α , цитотоксичен в отношении клеточной линии ретинобластомы Y79 человека (IC₅₀ 1,1 мкМ), клеток лейкемии линий CCRF-CEM и SR и линии клеток меланомы LOX IMVI (IC₅₀ 10 мкМ) [52].

Галотолерантные грибы

Галотолерантные грибы относят к экстремофильным микроорганизмам, так как они обитают в среде с высоким содержанием хлористого натрия, (например, Мёртвое море, соляные озера, соляные разработки, морские водоросли). Предполагается, что высокое содержание соли может пробудить «молчащие» гены, активировать уникальные биосинтетические пути и сделать возможным образование новых уникальных метаболитов. В связи с этим галотолерантные грибы привлекают внимание микробиологов и химиков. Грибы выделяют из морских водорослей [53], морских соляных разработок [54, 55], соляных озёр [56], морей [57, 58].

За последние годы с использованием галотолерантных штаммов грибов получен ряд новых метаболитов с новыми свойствами. Было установлено, что культивирование этой группы грибов приводит к биосинтезу новых компонентов только при содержании в среде не менее 10% NaCl [55, 56, 59].

Эндотрофный галотолерантный гриб *Aspergillus* sp. F00785 из морской водоросли синтезирует три новых соединения типа асперентина. Некоторые из них активны в отношении патогенных микроорганизмов [53].

Выделенный из морских соляных разработок штамм *Alternaria* синтезирует три новых цереброзида — альтернарозида, различающиеся по структуре жирной кислоты и обладающие слабой антимикробной активностью [54].

При культивировании выделенного из соляного бассейна Внутренней Монголии (Китай) штамма *Aspergillus varicolor* B-17 синтезируется два новых цитотоксичных хинона — вариколорхиноны А и В (рис. 7) и ряд родственных известных соединений. Струк-

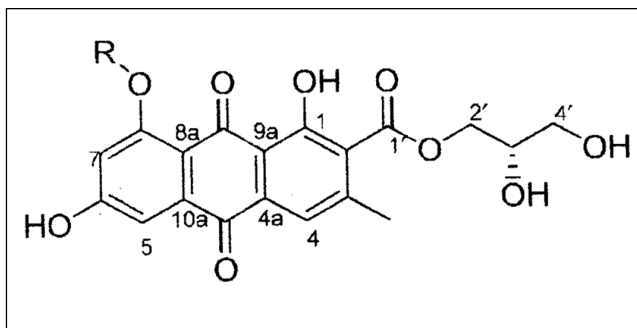


Рис. 7. Вариехинонколор [55]

тура компонента А представляет собой (2S')-2,3-дигидроксипропил-1,6,8-три-гидрокси-метил-9,10-диоксоантрацен-2- карбоновую кислоту. Новые вещества обладают цитотоксической активностью [55].

Галотолерантный штамм *P.notatum* D-52, выделенный из соляного озера Китая, синтезирует новое производное димера цитринина пеннициитрином D (рис. 8) вместе с ранее известными пеннициитрином А, цитринином и микофеноловой кислотой, которые, возможно, являются предшественниками при биосинтезе нового соединения [56].

Штамм *Spicaria elegans* KLA-03, выделенный из морских отложений, образует одно новое соединение — производное диакриловой кислоты (рис. 9) и четыре известных метаболита. Новый метаболит обладает активностью против *P.aeruginosa* и *E.coli* (МИК 0,038 и 0,767 мМ, соответственно) [57].

A.terreus PT06-2, выделенный из осадков разработок морской соли, синтезирует три новых соединения — терремида А и В и террелактон А, а также ранее известные метаболиты. Терремида А и В активны против *P.aeruginosa* и *Enterobacter aeruginosa*, МИК 63,9 и 33,5, соответственно [59].

Морской гриб *Trichoderma brevicompactum* на среде с пресной водой образует глиовирин, претриходермаид А и триходермаид А. Первые два вещества — эпидитиодикетопиперазины, содержащие необычные дисульфидные связи. В морской воде дополнительно образуются 5-хлоро-5-дезоксипроизводные этих веществ, а при добавлении к среде NaBr_2 или NaJ_2 — 5-бром- и 5-йод-производные, соответственно [60].

Культивирование морского гриба *Fusarium tricinctum* в присутствии CaBr_2 приводит к образованию бромированных аналогов хламидоспоролов А и В вместе с двумя известными хламидоспоролами. Основу этих структур составляют пиранопираноны. Все выделенные метаболиты умеренно активны против стафилококков, обладающих множественной устойчивостью, в том числе устойчивостью к метициллину [61].

Галогенированные природные соединения широко распространены в природе, многие из

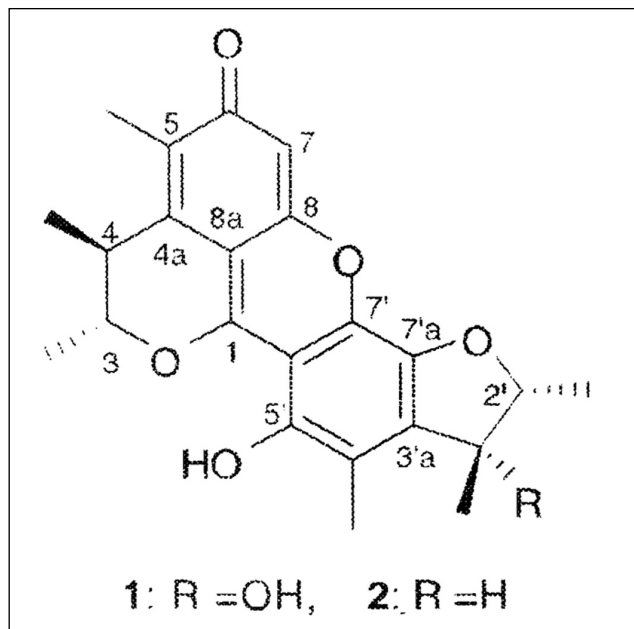


Рис. 8. Пеннициитрион [56]

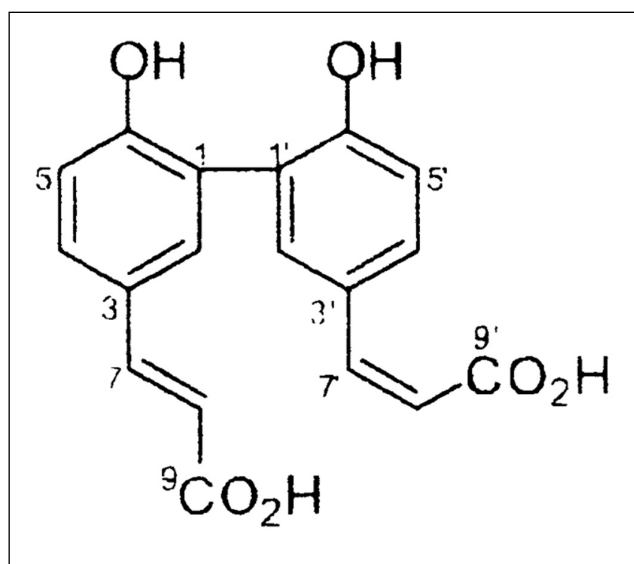


Рис. 9. Производное диакриловой кислоты [57]

них биологически активны. Поскольку для введения атома галогена в молекулу химическим путем требуются весьма жёсткие условия реакций, большой интерес представляет изучение процесса биосинтеза галогенированных природных продуктов и биотехнологического потенциала галогенирующих ферментов [62].

Среди микроскопических грибов, обитающих в морях, наиболее часто встречаются грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Литература об этих грибах как продуцентах новых биологически активных продуктов чрезвычайно обширна. Выше приведены лишь сведения относительно морских пенициллов и аспергиллов, связанные с проблемой

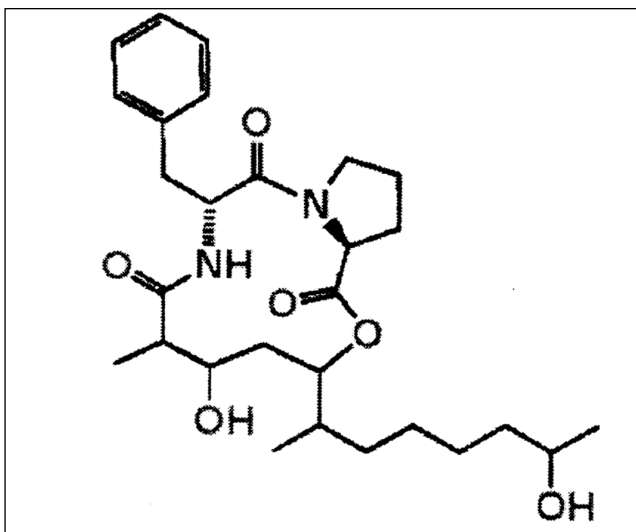


Рис. 10. Акремолид [64]

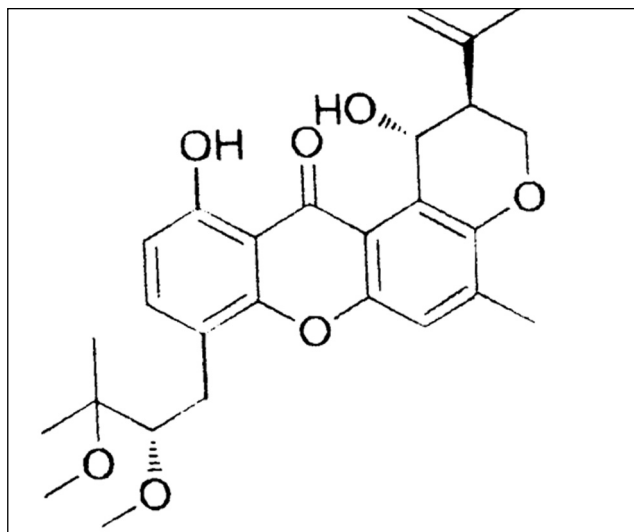


Рис. 11. Эмериксантон [70]

активации «молчащих» генов или с особенностями мест обитания грибов. Авторы считают целесообразным представить данные об этих двух категориях морских грибов и их продуктах в отдельной публикации.

Достаточно обширен и материал о некоторых других морских грибах, которые редко встречаются и редко культивируются. Однако таких грибов относительно много, и они также являются потенциальными источниками новых биологически активных соединений.

Ниже представлены данные относительно морских грибов разных родов, часто выделяемых из морских организмов и синтезирующих ряд новых, ранее не описанных метаболитов, обладающих биологической активностью.

Acremonium persicinum SCSIO 115 образует новые циклические гептапептиды (кордигептапептиды C-E). Соединения цитотоксичны в отношении ряда линий клеток рака в диапазоне IC_{50} 2,5–12,1 мкМ [63].

Acremonium sp. MST-MF588a синтезирует новое семейство липодепептидов — акремолиды A-D (рис. 10). В состав липопептидов входят аминокислоты фенилаланин и пролин, оксигирная оксикислота, между карбоксилем пролина и гидроксильной оксигирной кислоты установлена лактонная связь [64].

Новый трициклический лактон с уникальным скелетом акремостриктин синтезирует гриб *Acremonium strictum*, выделенный из морской губки с побережья Кореи. Лактон имеет незначительную антибиотическую активность и умеренные антиоксидантные свойства [65].

Два новых бензофенона акрединоны A и B были выделены из культуральной жидкости *Acremonium* sp. F9AO15, изолированного из морской губки. Вещества A и B ингибируют выброс

ионов K^+ из линии клеток, секретирующих инсулин-1 с IC_{50} 0,59 и 1,0 мкМ [66].

Acremonium sp. образует четыре новых сесквитерпеноида уникальной структуры и шесть ранее описанных производных. Скрининг, направленный на обнаружение противовоспалительных метаболитов (определение уровня провоспалительных медиаторов NO, интерлейкина-6, $TNF\alpha$ в макрофаговых клетках мыши), показал, что только некоторые из уже известных метаболитов ингибируют образование NO и $TNF\alpha$ при концентрации 100 мкМ [67].

Пять новых метаболитов — фузарантрахинон, три фузарнафтохинона и фузарон — были получены при культивировании штаммов гриба *Fusarium* sp. PSU, PSU-F14 и PSU-F135, выделенных из морских организмов. Одновременно синтезировалось еще 18 известных метаболитов [68].

Глубоководный гриб *Cladosporium sphaerospermum* синтезирует пять новых гибридных поликетидов кладозинов. Структуры соединений находятся в равновесном состоянии таутомерных превращений. Один из кладозинов незначительно активен против вируса гриппа H1N1 [69].

Cladosporium sp., выделенный из коралловых рифов Южно-Китайского моря, образует новый бициклический лактам и шесть известных 12-членных макролидов [24].

Два новых поликетидов — кладосполиды E и F синтезирует гриб *Cladosporium* T2P-29. Соединения обладают сильным гиполлипидемическим действием [33].

Грибы рода *Emericella* могут продуцировать разнообразные метаболиты — индольные алкалоиды, пренилированные поликетиды и другие структуры с различной биологической активностью.

Штамм *Emericella* sp. SCSIO 05240, выделенный из глубоководных морских осадков, при

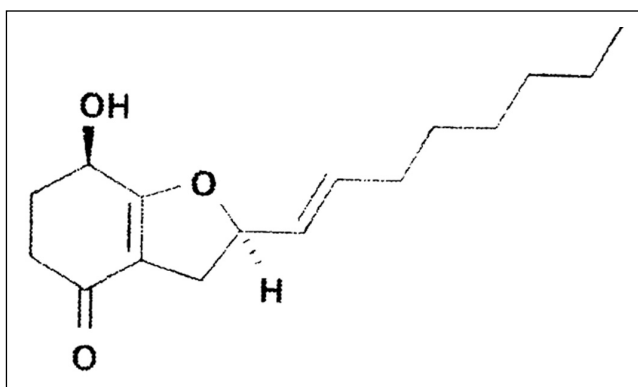


Рис. 12. Трихокетид [73]

культивировании на твёрдой среде образует четыре новых пренилированных ксантона — эмериксантоны А-D (рис. 11) и шесть известных аналогов. Новые варианты ксантона возникли в результате модификации заместителей в дигидрогенированном цикле ксантона, предположительно путём гидроксирования, окисления, хлорирования, метилирования и перегруппировок. Соединения А и С имеют незначительную антибактериальную активность, соединение D — умеренную антигрибную активность против сельскохозяйственных патогенов [70].

Выделенный из морской губки штамм *Emericella varicolor* синтезирует семь новых поликетидов — вариоксиранолы А-G, новый гибридный преноидный метаболит 19-О-метил-22-метоксипре-шамиксаитон, а также 9 его известных аналогов. Один из этих аналогов является ингибитором накопления липида в HepG2 клетках без цитотоксического эффекта, что сопровождается значительным снижением общего холестерина и триглицеридов. Вызываемое этим веществом снижение аккумуляции липидов происходит в результате понижающей регуляции экспрессии ключевого липогенного транскрипционного фактора SREBP-1c [71].

Два новых октакетида трихокетиды А и В выделены из культуральной жидкости гриба

Trichoderma TPU1237, полученного из морской водоросли.

Вещества являются эписимерами при С-8 дигидрофуранового цикла. Одновременно синтезируются два известных аналога — триходермакетоны С и D. Все соединения являются ингибиторами активности тирозинфосфатазы с IC_{50} 53,1, 65,1, 68,0, и 55,9 мкМ. Этот фермент играет ключевую роль в понижающем регулировании инсулин- и лептин-сигнальных систем, его активность важна при лечении таких заболеваний, как диабет, дисфункция иммунных систем [72].

Пять новых поликетидов, 7-О-метил-кониингин D и триходермакетоны А-D выделены из морского гриба *Trichoderma koningii*. Триходермакетоны В и С имеют необычный для поликетидов тетрациклический битетрафурановый скелет (рис. 12). Соединение В показало синергизм с кетоконазолом (0,05 мкг/мл против *Candida albicans* [73].

Морской гриб из губки, собранной в районе острова Окинава, определён как *Beauveria bassiana* TPU 942. Из культуральной жидкости гриба выделено новое соединение 1-гидрокси-10-метоксидибенз[*b,e*]оксепин-6,11. Соединения такой структуры редки в природе, это седьмой по счёту природный продукт этого класса. Гриб синтезирует также два известных вещества — хрисазин и глобосуксантон, обнаруживающих антигрибную активность. Последнее соединение активно в отношении двух линий раковых клеток человека НСТ-15 и Т-клеток лимфомы [74].

Один новый циклодепсипептид изо-изареин D, два новых О-содержащих гетероциклических соединения — фелиноны А и В и четыре известных циклодепсипептида получены при культивировании энтомопатогенного гриба *Beauveria feline* EN-135, выделенного из морских полипов. Новое вещество содержит аминокислоты аланин, лейцин, Валин, пролин и остаток β-гидрокси-алифатической кислоты, т.е. является циклогептадепсипептидом [75].

Выделенный из морской губки гриб *Stachybotrys* sp. XX1-ZSDSIF-1-2 синтезирует два

Таблица 1. Цитотоксичные вторичные метаболиты из морских грибов

Название метаболита	Продуцент	Источник
Стероиды С-25	<i>Penicillium purpurogenum</i>	10
Цитоспорон Е	<i>Leucostoma persoonii</i>	12
Клаватустид В	<i>Aspergillus clavatus</i> C2WU	13,14
Кариофиллены	<i>Ascotricha</i> sp. ZJ-M-5	19
Бициклический лактам	<i>Cladosporium</i> sp.	24
Поликетиды, содержащие ненасыщенный лактон	<i>Aspergillus</i> sp. 16-021	39
Эремофилан сесквитерпен	<i>Penicillium</i> sp. PR19 N-I	44
Берказафилон	<i>Penicillium rubrum</i>	51
Беркхетоазафилон	<i>Pleurostomophora</i> sp.	52
Вариколорхиноны	<i>Aspergillus varicolor</i> B-17	55
Кордигептапептиды	<i>Acremonium persicinum</i> SCSIO 115	63
Глобосуксантон А	<i>Beauveria bassiana</i> TPU 942	74
Производные ксантонов	<i>Stachybotrys</i> sp. XX1-ZSDSIF-1-2	76

Таблица 2. Антимикробные вторичные метаболиты (антибиотики) из морских грибов

Название метаболита	Продуцент	Источник
Цитоспорон Е	<i>Leucostoma persoonii</i>	12
Энниатины	<i>Fusarium tricinatum</i> и <i>Bacillus subtilis</i>	17
Эмерицелламид	<i>Emericella</i> sp. и <i>Salinospora arenicola</i>	18
Не идентифицированы	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> и <i>Cladosporium</i>	22
Поликетид пенилин С	<i>Penicillium</i> sp. SCSGAF0023	23
Гидроксипенициллит	<i>Penicillium pinophilum</i> XS-20090E18	25
Триходины А и В	<i>Trichoderma</i> sp. MF-106	42
Терремиды А и В	<i>Aspergillus terreus</i> PT06-2	59
Диакриловая кислота (производные)	<i>Spicaria elegans</i> KLA-03	57
Пиранопираноны А и В	<i>Fusarium tricinatum</i>	61
Пренилированные ксантоны	<i>Emericella</i> sp. SCSIO 05240	70
Акремостриктин	<i>Acremonium strictum</i>	65
Триходермакетон	<i>Trichoderma koningii</i>	73

Таблица 3. Ингибиторы метаболитических процессов или вирусов — вторичные метаболиты из морских грибов

Название метаболита	Действие	Продуцент	Источник
Кладосполид Е	Гиполипидемическая активность в HepG-2 гепатоцитов	<i>Cladosporium</i> sp. TZP-29	33
Яминтерритрем В	Ингибитор экспрессии циклооксигеназы в LPS-стимулированных макрофагах	<i>Aspergillus terreus</i>	40
Охрацеопоны	Ингибиторы вирусов H1N1 и H3N2	<i>Aspergillus ochraceopetaliformis</i> SCSIO 05702	46
Беркелидраймены	Ингибиторы сигнала трансдукции каспаз-1 и -3	<i>Penicillium solutum</i>	50
Кладозин С	Ингибитор вируса H1N1	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	69
Вариоксиранол	Ингибитор накопления липидов в клетках HepG-2	<i>Emericella varicolor</i>	71
Трихокетиды	Ингибиторы тирозинфосфатазы Е	<i>Trichoderma</i> TPU1237	72
Производные ксантона	Ингибиторы кишечного вируса EV71	<i>Stachybotrys</i> sp. XX1-ZSDSIF-1-2	76
Сесквитерпены	Ингибиторы тирозиназы	<i>Pestalotiopsis</i> sp. Z233	15
Дигидрохинолоны	Ингибиторы респираторного вируса RSV	<i>Aspergillus</i> sp. XS-20090B15	26
Производные антрахинона	Активность против вируса свиного репродуктивного и респираторного синдрома	<i>Alternaria</i> sp. ZJ-2008003	34
Эутипоиды В-Е	Ингибиторы активности гликоген синтазы киназы	<i>Penicillium</i> sp. K3620	47
Акрединоны	Ингибиторы выброса ионов K ⁺ из клеток, образующих инсулин	<i>Acremonium</i> sp. F9AO1	66

новых и четыре известных сесквитерпеноида, а также два новых и восемь известных производных ксантина. Некоторые из полученных соединений цитотоксичны, ингибируют активность циклооксигеназы-2, действуют на вирус EV71 кишечника [76]. Из культуральной жидкости морского штамма *Stachybotrys* sp. выделены два спироциклических драймена. Один из них состоит из двух блоков — спиродигидробензофуранлактама и спиродигидроизобензофурана, место связывания структур — C-N вместо традиционной N-N связи. Одновременно образуется ряд спироциклических известных драйменов, а также сесквитерпен. Два спироциклических драймена и сесквитерпен активны против клинических изолятов устойчивых к метициллину стафилококков [77].

В табл. 1–3 приведены суммарные данные о характере биологической активности описанных выше вторичных метаболитов, синтезируемых морскими грибами. В табл. 1 представлены метаболиты, обладающие цитотоксической активностью, в табл. 2 — метаболиты с антимикробной активностью, в табл. 3 — метаболиты,

ингибирующие различные метаболитические процессы или вирусы.

Заключение

Приведенные нами экспериментальные данные, опубликованные в специализированных научных журналах, создают картину интенсивного изучения морских грибов в качестве продуцентов потенциальных или резервных биологически активных природных продуктов. Предложены и используются стратегии пробуждения «молчащих» генов, в частности: «Один штамм — много соединений».

Просматривается зависимость между условиями обитания и некоторым предпочтением тех или иных условий для определённых родов грибов. Морские грибы чаще всего находятся в ассоциации с другими морскими организмами, особенно с губками. Для морских грибов характерно большое разнообразие синтезируемых химических структур, которые устанавливаются современными бездеградационными методами. Химическое разнообразие возникает за счёт модификаций пептидов,

дикетопиперазинов, дитиокетопиперазинов, ме-ро- и сесквитерпеноидов, гетероциклов, полике-тидов и др. Спектр биологической активности ве-ществ: цитотоксичные по отношению к большому количеству клеточных линий рака человека, анти-вирусные, антибактериальные (в том числе актив-ные против устойчивых к антибиотикам штам-

мов), ингибиторы метаболических процессов, важных для лечения ряда заболеваний.

Исследования в области синтетической мик-робиологии [78] показали, что нитчатые грибы достаточно доступны для генетических манипу-ляций и могут стать бесценной основой для раз-вития синтетической микробиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dyshlovoy S.A., Honecker F. Marine compounds and cancer: Where do we stand? *Mar Drugs* 2015; 13: 5657–5665.
2. Zheng L.-N., Wang Y.-J., Sheng J. et al. Antitumor peptides from marine organisms. *Mar Drugs* 2011; 9: 1840–1859.
3. Stonic V.A., Fedorow S. Marine low molecular weight natural products as potential cancer preventive compounds. *Mar Drugs* 2014; 12: 2: 636–671.
4. Fouilaud M., Venkatachlam M., Girand-Valenciennes E. et al. Anthraquinone and derivatives from marine-derived fungi: structural diversity and selected biological activities. *Mar Drugs* 2016; 14: 4: pii E64
5. Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A. et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2016; 33: 3: 382–431.
6. Imhoff J. Natural products from marine fungi — still an underrepresented resource. *Mar Drugs* 2016; 14: 1: 19.
7. Kjer J., Debbab A., Aly A.N., Proksch P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat Protoc* 2010; 5: 3: 479–490.
8. Xiong Z.-Q., Wang J.-F., Hao Y.-Y., Wang Y. Recent advances in the discovery and development of marine microbial products. *Mar Drugs* 2013; 11: 3: 700–717.
9. Reen F.J., Romano S., Dobson A.D., O'Gara. The sound of silence: activating silent biosynthetic gene clusters in marine microorganisms. *Mar Drugs* 2015; 13: 8: 4754–4783.
10. Xia M.-W., Cui C.-B., Li C.-W., Wu C.-J. Three new and eleven known unusual C25 steroids: activated production of silent metabolites in a marine-derived fungus by chemical mutagenesis strategy using diethyl sulphate. *Mar Drugs* 2014; 12: 3: 1545–1568.
11. Dong Y., Cui C.-B., Li C.-W. et al. Activation of dormant secondary metabolite production by introducing neomycin resistance into the deep-sea fungus, *Aspergillus versicolor* ZBY-3. *Mar Drugs* 2014; 12: 8: 4326–4352.
12. Bean J., Mahid N., Burda W.N. et al. Epigenetic tailoring for the production of anti-infective cytosporones from the marine fungus *Leucostoma peroonii*. *Mar Drugs* 2012; 10: 4: 762–774.
13. Jiang W., Ye P., Chen C.T. et al. Two novel hepatocellular carcinoma cycle inhibitory cyclodepsipeptides from a hydrothermal vent crab-associated fungus *Aspergillus clavatus* C2WU. *Mar Drugs* 2013; 11: 12: 4761–4772.
14. Ye P., Shen L., Jiang W. et al. Zn-driven discovery of a hydrothermal vent fungal metabolite clavustidine C, and an experimental study of the anti-cancer mechanism of clavustidine B. *Mar Drugs* 2014; 12: 6: 3203–3217.
15. Wu B., Wu X., Sun M. et al. Two novel tyrosinase inhibitory sesquiterpenes induced by CuCl₂ from a marine-derived fungus *Pestalotiopsis* sp.Z233. *Mar Drugs* 2013; 11: 8: 2713–2721.
16. Marmann A., Aly A.N., Lin W. et al. Co-cultivation — a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Mar Drugs* 2014; 12: 2: 1043–1065.
17. Ola A.R.B., Thomy D., Lai D. et al. Inducing secondary metabolite production by endophytic fungus *Fusarium tricinatum* coculture with *Bacillus subtilis*. *J Nat Prod* 2013; 76: 11: 2094–2099.
18. Oh D.-C., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emicella* sp. In competing co-culture. *J Nat Prod* 2007; 70: 4: 515–520.
19. Wang W.-J., Li D.-Y., Li Y.-C. et al. Caryophyllene sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5 by the one strain — many compounds strategy. *J Nat Prod* 2014; 77: 6: 1367–1371.
20. Liu Y., Li X.-M., Meng L.-H. et al. Bisthiodiketopiperazines and acorane sesquiterpenes produced by from the marine-derived fungus *Penicillium adametzioides* AS-53 on different culture media. *J Nat Prod* 2015; 78: 6: 1294–1299.
21. Liang W.-L., Le X., Li H.-J. et al. Exploring the chemodiversity and biological activities of secondary metabolites from the marine fungus *Neosartorya pseudofischeri*. *Mar Drugs* 2014; 12: 11: 5657–5676.
22. Wang Y.-N., Shao C.-L., Zheng C.-J. et al. Diversity and antibacterial activities of fungi derived from the Gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea. *Mar Drugs* 2011; 9: 8: 1379–1390.
23. ao J., Sun U.-L., Zhang X.-Y. et al. Antifouling and antibacterial polyketides from marine gorgonian coral-associated fungus *Penicillium* sp. SCSGAF 0023. *J Antibiot* 2013; 66: 4: 219–223.
24. Cao F., Yang Q., Shao C.-L. et al. Bioactive 7-oxabicyclic{6.3.0}lactam and 12-membered macrolides from a gorgonian-derived *Cladosporium* sp. fungus. *Mar Drugs* 2015; 13: 7: 4171–4178.
25. Zhao D.-L., Shao C.-L., Zhang Q. et al. Asaphilone and diphenyl ether derivatives from a gorgonian-derived strain of the fungus *Penicillium pinophilum*. *J Nat Prod* 2015; 78: 9: 2310–2314.
26. Chen M., Shao C.-L., Meng H. et al. Anti-respiratory syncytial virus prenylated dihygroquinolone derivatives from the gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. XS-20090B15. *J Nat Prod* 2014; 77: 12: 2720–2724.
27. Chen M., Wang K.-L., Liu M. et al. Bioactive steroid derivatives and butyrolactone derivatives from a gorgonian-derived *Aspergillus* sp. fungus. *Chem Biodivers* 2015; 12: 9: 1398–1406.
28. Nong X.-H., Zheng Z.-H., Zhang X.-Y. et al. Polyketides from a marine-derived fungus *Xylariaceae* sp. *Mar Drugs* 2013; 11: 5: 1718–1727.
29. Chen M., Shao C.-L., Fu X.-M. et al. Lumazine peptides penilumamides B-D and the cyclic pentapeptide asperpeptide A from a gorgonian-derived *Aspergillus* sp. fungus. *J Nat Prod* 2014; 77: 7: 1601–1606.
30. Li H.-J., Xie Y.-L., Xie Z.-L. et al. Chondrosterins A-E, triquinane-type sesquiterpenoids from soft coral-associated fungus *Chondrostereum* sp. *Mar Drugs* 2012; 10: 3: 627–638.
31. Li H.-J., Chen T., Xie Y.-L. et al. Isolation and structural elucidation of chondrosterins F-H from the marine fungus *Chondrostereum* sp. *Mar Drugs* 2013; 11: 2: 551–558.
32. Zheng C.-J., Shao C.-L., Chen M. et al. Merodesquiterpenoids and ten-membered macrolides from a soft coral-derived *Lophiostoma* sp. fungus. *Chem Biodivers* 2015; 12: 9: 1407–1414.
33. Zhu M., Gao H., Wu C. et al. Lipid-lowering polyketides from a soft coral-derived fungus *Cladosporium* sp. TZP29. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25: 17: 3606–3609.
34. Zheng C.-J., Shao C.-L., Guo Z.-Y. et al. Bioactive hydroanthraquinones and anthraquinone dimers from a soft coral-derived *Alternaria* sp. fungus. *J Nat Prod* 2012; 75: 2: 189–197.
35. Liu J., Li F., Kim E.L. et al. Antibacterial polyketides from the jellyfish-derived fungus *Paecilomyces variotii*. *J Nat Prod* 2011; 74: 8: 1826–1829.
36. Wang H., Hong J., Yin J. et al. Dimeric octaketide spiroketals from the jellyfish-derived fungus *Paecilomyces variotii* J08NF-1. *J Nat Prod* 2015; 78: 11: 2832–2836.
37. Teske A., Reysenbach A.-L. Editorial: Hydrothermal microbial ecosystems. *Front Microbiol* 2015; 6: 884.
38. Thornburg C.C., Zabriskie T.M., McPhail K.L. Deep-sea hydrothermal vents: potential hot spots for natural products discovery. *J Nat Prod* 2010; 73: 3: 489–499.
39. Chen X.-W., Li C.-W., Cui C.-B. et al. Nine new and five known polyketides derived from a deep sea-sourced *Aspergillus* sp.16-02-1. *Mar Drugs* 2014; 12: 6: 3116–3137.
40. Liaw C.-C., Yang Y.-L., Lin C.-K. et al. New meroterpenoids from *Aspergillus terreus* with inhibition of cyclooxygenase-2 expression. *Org Lett* 2015; 17: 10: 2330–2333.
41. Li Y., Ye D., Shao Z. et al. A sterol and spiroditerpenoids from a *Penicillium* sp. isolated from a deep sea sediment sample. *Mar Drugs* 2012; 10: 2: 497–506.
42. Wu B., Oesker V., Wiese J. et al. Two new antibiotic pyridones produced by a marine fungus, *Trichoderma* sp. strain MF106. *Mar Drugs* 2014; 12: 3: 1208–1219.
43. Figueroa L., Jime'nez C., Rodriques J. et al. 3-Nitroasterric acid derivatives from an antarctic sponge-derived *Pseudogymnoascus* sp. fungus. *J Nat Prod* 2015; 78: 4: 919–923.
44. Wu G., Lin A., Gu Q. et al. Four new chloro-eremophilane sesquiterpenes from an antarctic deep-sea derived fungus, *Penicillium* sp. PR19N-1. *Mar Drugs* 2013; 11: 4: 1399–1408.
45. Schulz D., Ohlendorf B., Zinecker H. et al. Eutypoids B-E produced by a *Penicillium* sp. strain from the North sea. *J Nat Prod* 2011; 74: 1: 99–101.
46. Wang J., Wei X., Qin X. et al. Antiviral merodesquiterpenoids produced by the antarctic fungus *Aspergillus ochraceopetaliformis* SCSIO 05702. *J Nat Prod* 2016; 79: 1: 59–65.
47. Lu X.-L., Liu J.-T., Liu X.-Y. et al. Pimarane diterpenes from the arctic fungus *Eutypella* sp. D-1. *J Antibiot* 2014; 67: 2: 171–174.

48. Stierle D.B., Stierle A.A., Patacini B. The berkeleyacetals, three meroterpenes from a deep water acid mine waste *Penicillium*. J Nat Prod 2007; 70: 11: 1820—1823.
49. Stierle A.A., Stierle D.B., Patacini B. The berkeleyamides, amides from the acid lake fungus *Penicillium rubrum*. J Nat Prod 2008; 71: 5: 856—860.
50. Stierle D.B., Stierle A.A., Girtsman T. et al. Caspase-1 and -3 inhibiting drimane sesquiterpenoids from the extremophilic fungus *Penicillium solitum*. J Nat Prod 2012; 75: 2: 262—266.
51. Stierle D.B., Stierle A.A., Girtsman T. Caspase-1 inhibitors from an extremophilic fungus that target specific leukemia cell lines. J Nat Prod 2012; 75: 3: 344—350.
52. Stierle A.A., Stierle D.B., Girtsman T. et al. Azaphilones from an acid mine extremophile strain of a *Pleurostomophora* sp. J Nat Prod 2015; 78: 12: 2917—2923.
53. Tang Q., Guo K., Li X-Y et al. Three new asperterin derivatives from the algicolous fungus *Aspergillus* sp. F00785. Mar Drugs 2014; 12: 12: 5993—6002.
54. Wang W., Wang Y., Tao H. et al. Cerebrosides of the halotolerant fungus *Alternaria raphani* isolated from a sea salt field. J Nat Prod 2009; 72: 9: 1695—1698.
55. Wang W., Zhu T., Tao H. et al. Two new cytotoxic quinine type compounds from the halotolerant fungus *Aspergillus varicolor*. J Antibiot 2007; 60: 10: 603—607.
56. Xin Z-H., Wang W-L., Zhang Y-P. et al. Pennicitrinone D, a new citrinin dimmer from the halotolerant fungus *Penicillium notatum* B-52. J Antibiot 2009; 62: 4: 225—227.
57. Wang Y., Lu Z., Sun K., Zhu W. Effect of high salt stress on secondary metabolite production in the marine-derived fungus *Spicaria elegans*. Mar Drugs 2011; 9: 4: 535—542.
58. Li Y., Ye D., Chen X. et al. Breviane spiroditerpenoids from an extreme-tolerant *Penicillium* sp. isolated from a deep sea sediment sample. J Nat Prod 2009; 72: 5: 912—916.
59. Wang Y., Zheng J., Liu Pm et al. Three new compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 grown in a high salt medium. Mar Drugs 2011; 9: 8: 1368—1378.
60. Yamazaki H., Rotinsulu H., Narita R. et al. Induced production of halogenated epidithiodiketopiperazines by a marine-derived *Trichoderma* cf. *brevicompactum* with sodium halides. J Nat Prod 2015; 78: 10: 2319—2321.
61. Nenkep V., Yun K., Zhang D. et al. Induced production of bromomethylchlamydosporols A and B from the marine-derived fungus *Fusarium tricinatum*. J Nat Prod 2010; 73: 12: 2061—2063.
62. Wagner C., El Omari M., König G.M. Biohalogenation: nature's way to synthesize halogenated metabolites. J Nat Prod 2009; 72: 3: 540—553.
63. Chen Z., Song Y., Chen Y. et al. Cyclic heptapeptides, cordyheptapeptides C-E, from the marine-derived fungus *Acremonium persicinum* SCSIO 115 and their cytotoxic activities. J Nat Prod 2012; 75: 6: 1215—1219.
64. Patnayake R., Fremlin L.J., Lacey E. et al. Acremolides A-D, lipodepsipeptides from an Australian marine-derived fungus, *Acremonium* sp. J Nat Prod 2008; 71: 3: 403—408.
65. Julianti E., Oh H., Jang K.H. et al. Acremostictin, a highly oxygenated metabolite from the marine fungus *Acremonium strictum*. J Nat Prod 2011; 74: 12: 2592—2594.
66. Kim H., Yang I., Ryu S-Y et al. Acredinones A and B, voltage-dependent potassium channel inhibitors from the sponge-derived fungus *Acremonium* sp. J Nat Prod 2015; 78: 3: 363—367.
67. Zhang P., Bao B., Dang H.T. et al. Anti-inflammatory sesquiterpenoids from a sponge-derived fungus *Acremonium* sp. J Nat Prod 2009; 72: 2: 270—275.
68. Trisuwan K., Khamthong N., Rukachaisirikul V. et al. Anthraquinone, cyclopentanone and naphthoquinone derivatives from the sea fan-derived fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135. J Nat Prod 2010; 73: 9: 1507—1511.
69. Wu G., Sun X., Yu G. et al. Cladosins A-E, hybrid polyketides from a deep-sea -derived fungus, *Cladosporium sphaerospermum*. J Nat Prod 2014; 77: 2: 270—275.
70. Fredimoses M., Zhou X., Lin X. et al. New prenylxanthones from the deep-sea derived fungus *Emericella* sp. SCSIO 05240. Mar Drugs 2014; 12: 6: 3190—3202.
71. Wu Q., Wu C., Long R. et al. Varioxiranols A-G and 19-O-methyl-22-methoxy-pre-shamixanthone, PKS and hybrid PKS-derived metabolites from a sponge-associated *Emericella varicolor* fungus. J Nat Prod 2015; 78: 10: 2461—2470.
72. Yamazaki H., Saito R., Takahashi O. et al. Trichoketides A and B, two new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. J Antibiot 2015; 68: 10: 628—632.
73. Song F., Dai H., Tong Y. et al. Trichodermaketones A-D and 7-0-methylkoninginin D from the fungus *Trichoderma koningii*. J Nat Prod 2010; 73: 5: 806—810.
74. Yamazaki H., Rotinsulu H., Kaneko T. et al. A new dibenz[b,e]oxepine derivative, 1-hydroxy-10-methoxy-dibenz[b,e]oxepine-6,11-dione, from a marine-derived fungus *Beauveria bassiana* TPU942. Mar Drugs 2012; 10: 12: 2691—2697.
75. Du F-Y, Li X-M, Zhang P. et al. Cyclodepsipeptides and other O-containing heterocyclic metabolites from *Beauveria felina* EN-135, a marine-derived entomopathogenic fungus. Mar Drugs 2014; 12: 5: 2816—2826.
76. Oin C., Lin X., Lu X. et al. Sesquiterpenoids and xanthones derivatives produced by sponge-derived fungus *Stachybotrys* sp. HH1 ZSDS1F1-2. J Antibiot 2015; 68: 2: 121—125.
77. Wu B., Oesker V., Wiese J. Spirocyclic drimanes from the marine fungus *Stachybotrys* sp. strain MF347. Mar Drugs 2014; 12: 4: 1924—1938.
78. Mattern D.J., Valiante V., Unkles S.E., Brakhage A.A. Synthetic biology of fungal natural products. Front Microbiol 2015; 6: 775.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Орлова Тамара Ивановна — д.м.н., старший научный сотрудник; старший научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, Москва

Булгакова Вера Георгиевна — к.б.н., старший научный сотрудник; старший научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, Москва

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

Ингибирующее действие полисахаридов морских гидробионтов на формирование биопленок

Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, И. Д. МАКАРЕНКОВА¹, Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА², Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Inhibitory Effect of Polysaccharides of Marine Hydrobionts on Biofilm Formation

N. N. BESEDNOVA¹, I. D. MAKARENKOVA¹, T. N. ZVYAGINTSEVA², T. A. KUZNETSOVA¹, T. S. ZAPOROZHETS¹

¹ G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

² G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok

В обзоре представлены материалы последних лет, касающиеся перспектив применения полисахаридов (ПС) из морских гидробионтов для борьбы с бактериальными биоплёнками, играющими значительную роль в возникновении и течении различных инфекционных процессов, а также для конструирования антиадгезионных покрытий на изделиях медицинского назначения. Особое внимание обращено на антиадгезивные свойства природных ПС из морских микроорганизмов, водорослей и беспозвоночных животных, препятствующих образованию биопленок. Антибиопленочные ПС морского происхождения имеют такие положительные качества, как биосовместимость и биоразлагаемость, что представляет большой интерес для медицинского и промышленного применения. Рассматривается возможность одновременного применения при инфекциях, сопровождающихся образованием биопленок, комплекса соединений различной химической природы с разными механизмами действия. Авторы полагают, что основой для создания новых антибиопленочных препаратов, в том числе и комплексных, могут стать биологически активные вещества из морских гидробионтов.

Ключевые слова: полисахариды морских гидробионтов, биоплёнки, адгезия микроорганизмов, антибиотики.

In the review there are considered the recent data on the perspectives of the use of polysaccharides (PS) from marine hydrobionts for inhibition of formation of bacterial biofilms, which play a significant role in the onset and process of different infections, as well as for design of antiadhesive coatings on medical produce. Particular attention is paid to antiadhesive properties of natural PS from marine microorganisms, algae and invertebrate animals, which prevent formation of biofilms. Antibiofilm PS possess such positive characteristics, as biocompatibility and biodegradability, that is of great interest for medical and industrial applications. The possibility of simultaneous use of complexes of compounds of different chemical nature and mechanisms of action in infectious diseases, involving biofilm formation is of special interest. It is believed that biologically active substances from marine hydrobionts could serve as the basis for development of new antibiofilm drugs, including complex ones.

Key words: polysaccharides of marine hydrobionts, biofilms, microbial adhesion, antibiotics.

Введение

Микробная биоплёнка является ключевой фазой бактериального развития, сопряжённого с выживанием бактерий и формированием хронической инфекции.

В настоящее время считается, что более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в виде биоплёнок [1]. Среди них инфекции сердечных клапанов, раневых поверхностей, гингивиты, стоматиты, образование зубного камня, бактериальные и грибковые отиты, кишечные инфекции и пр. В связи с высокой агрессивностью патогенных микроорганизмов по сравнению с комменсалами

происходит преимущественное заселение ими любых инородных тел, вводимых в организм человека. Биоплёнки образуются на постоянных катетерах, контактных линзах, эндопротезах, эндоскопах и пр. [2]. Несмотря на усилия исследователей, на сегодняшний день еще не разработаны материалы, которые бы не подвергались биологическому обрастанию [3].

Результаты исследований, опубликованные в последние годы, свидетельствуют о том, что учёные только приблизились к пониманию фундаментальных принципов феномена плёнокообразования. Микробиология в этом вопросе находится пока на этапе эмпирического накопления знаний.

Известно, что микроорганизмы в составе биоплёнки отрицательно влияют на течение хронических воспалительных заболеваний, поскольку обладают высоким уровнем толерантности к ан-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1. НИИ эпидемиологии и микробиологии

тителам, антибиотикам, ксенобиотикам, антисептикам, дезинфектантам и фагоцитам [4].

Помимо медицинских аспектов, микробные биоплёнки создают серьёзные проблемы для промышленности, производства аквакультуры, в связи с чем оказывают негативное воздействие на мировую экономику. Все это диктует необходимость поиска и разработки новых эффективных средств и способов воздействия на биоплёнки [5].

Настоящий обзор посвящён современным представлениям об ингибирующем действии полисахаридов (ПС), получаемых из морских гидробионтов — микроорганизмов, беспозвоночных животных, водорослей, на образование биоплёнок.

Терапевтическое воздействие на биоплёнки может быть направлено на механизмы первоначальной стадии её формирования — адгезию бактерий к поверхности, синтез полимерного матрикса, межклеточный обмен информацией, а также может сочетаться с действием собственно бактерицидных агентов. Такое лечение, воздействующее на структуру или функции биоплёнок, может оказаться более эффективным, чем стандартная антибактериальная терапия.

Одним из наиболее известных приёмов, с учётом которого осуществляется подбор ингибиторов процесса адгезии, является введение в систему «микроорганизм-эукариотические клетки» растворимых веществ, конкурирующих с лигандами или рецепторами за места связывания на клеточных поверхностях [6]. При этом все растворимые соединения способны реагировать или с возбудителем, или с эукариотической клеткой. Предпочтительнее, однако, избирательное связывание лигандов микроорганизма, так как оно в меньшей степени влияет на рецепторный аппарат клеток-мишеней, а через него — на самые разнообразные процессы в тканях макроорганизма.

Применение природных или синтетических аналогов клеточных рецепторов и компонентов тканевых жидкостей способно значительно снизить, а в отдельных случаях и полностью предотвратить прикрепление микроорганизмов к клеткам хозяина.

Возможность использования углеводов для защиты от экспериментальных инфекций путём уменьшения степени адгезии микроорганизмов за счёт конкурентного взаимодействия впервые была показана в 1979 г. [7]. Заблокировать прикрепление бактерий к абиогенным субстратам удавалось при помощи полисахаридов декстрана, декстран-сульфата, гепарина.

S. Barghouthi et al. (1996) показали, что декстран с молекулярной массой (М. м.) 3000—70000 тормозит прикрепление *Pseudomonas aeruginosa* к лёгочным и буккальным эпителиоцитам [8]. Такое же действие оказывали и другие нейтральные ПС (гликоген, маннан), подавляющие прикреп-

ление к эпителиоцитам не только *P. aeruginosa*, но и других респираторных патогенов (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*). Описано «растворение» субстрата — образовавшейся биоплёнки в сосудистом устройстве (катетеры) под действием гепарина — сульфатированного полисахарида [9].

В последние годы появились работы, в которых авторы в качестве антиплёночных соединений предлагают рассмотреть экзополисахариды (ЭПС) морских бактерий — как свободноживущих, так и симбионтов, а также экстракты и ПС из других морских гидробионтов (беспозвоночных животных, водорослей), что является новым подходом к уничтожению биоплёнок, поскольку ЭПС обладают антиадгезивными свойствами и не затрагивают жизнеспособность бактерий, в связи с чем не создают условий для появления мутантов, устойчивых к антибиотикам.

Первое взаимодействие между бактериями и абиотической и биотической поверхностью (адгезия) имеет решающее значение для образования биоплёнки [10]. Для первичного (обратимого) прикрепления планктонные бактерии должны иметь готовые адгезины или быстро менять адгезивный фенотип, адаптируя его к субстрату. Например, к первичным адгезинам *P. aeruginosa* относятся жгутики, пили IV типа и пилеобразные структуры — Сур-фимбрии [4], неспецифически прикрепляющиеся к биогенным и абиогенным субстратам, обеспечивая начало биоплёночного процесса. После адгезии бактерии прекращают активное движение и начинают размножаться, формируя многоклеточные скопления (микроколонии) бактерий, характерные для зрелой биоплёнки. Так, например, мутанты *P. aeruginosa* с повреждёнными жгутиками или пилиями значительно медленнее прикрепляются к поверхности глазных линз, чем их интактные варианты [11].

Одной из основных проблем, препятствующих внедрению в практику антиадгезионной терапии, является достижение возможности конкуренции ингибитора с бактериями, т.е. наличие достаточного числа молекул адгезии на ингибиторе, т.к. бактерии чаще всего несут на своей поверхности сотни молекул адгезии. В связи с этим было намечено много путей преодоления этой проблемы — создание полимерных ингибиторов (такими соединениями, например, являются сульфатированные ПС морских водорослей), дендримеров [12], наночастиц [13]. Поливалентные ингибиторы к тому же могут использоваться в более низких концентрациях, чем моновалентные.

Экзополисахариды морских бактерий

Метаболиты бактериальных экзополисахаридов (ЭПС) играют решающую роль в предотвра-

шении начальной адгезии бактерий, а также в формировании биоплёнки в поздних стадиях её существования.

Чаще всего в качестве тест-культур для изучения антиплёночного действия биологически активных веществ (БАВ) из гидробионтов используют стафилококки — *S.aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, а также синегнойную палочку *P.aeruginosa*, поскольку эти микроорганизмы наиболее часто образуют биоплёнки при заболеваниях у людей. Так, золотистым стафилококком колонизированы примерно 30% населения США, а 1,5% из них являются носителями метицилиноустойчивых стафилококков, с которыми связывают возникновение внутрибольничных инфекций [14]. Недавно появилось сообщение о том, что уровень смертности от заболеваний, связанных с метицилиноустойчивым стафилококком, превышает таковой от многих других инфекционных болезней, включая СПИД [14]. Эпидермальный стафилококк является синантропным микроорганизмом кожи человека при нарушении эпителиальных барьеров, особенно при образовании плёнки, и тоже может вызывать серьёзные заболевания, особенно при установке различных медицинских устройств (катетеров, различных протезов и пр.). Синегнойная палочка — частый возбудитель заболеваний дыхательной системы и ран различного генеза, трудно поддающийся эрадикации, особенно в случаях образования биоплёнки.

Бактериальные экзополисахариды получают из супернатантов культур. В работе О. Renduelles et al. [15] представлены примеры антиплёночных ЭПС как морских бактерий (*Vibrio* sp. QY 101), так и наземных, например, ацидофильной палочки. Из супернатантов некоторых морских микроорганизмов были выделены ЭПС, обладающие антибиопленочной активностью [16, 17]. S. M. Abu Sayem et al. [18] описали активность супернатантов десяти различных штаммов бактерий, ассоциированных с морской губкой *Spongia officinalis*. Два из них значительно ингибировали образование биоплёнки *Escherichia coli*. Один из активных супернатантов, полученный из бактерии *Bacillus licheniformis* (другое название — *Bacillus subtilis*, сенная палочка), тормозил образование плёнки не только кишечной палочкой, но и *Acinetobacter* sp., *S.aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* и *B.subtilis* без ингибирования роста этих микроорганизмов. Сенная палочка, послужившая в данном случае продуцентом ЭПС, — обитатель водоемов. Источником жизнедеятельности этого микроорганизма являются органические вещества, характерные для донных отложений — листва, фекалии рыб и водоплавающих птиц, отмершие водные растения.

Эти микроорганизмы безвредны для человека и животных, характеризуются высокой ферментативной активностью, что обеспечивает связывание и быструю деградацию органических веществ, радионуклидов, тяжёлых металлов. Кроме того они синтезируют различные бактериоцины, что обуславливает их высокую антагонистическую активность в отношении широкого спектра патогенных и условно патогенных микробов.

Авторы показали, что действующим началом супернатанта бактерий *B.licheniformis* является ПС, представляющий собой полимер с М. м. 1800 kDa, построенный из остатков α -D-галактопиранозил-(1→2)-глицерол-фосфата. Обработка полисахаридом абиотических поверхностей препятствовала адгезии и образованию биоплёнки штаммами *E.coli* PHL 628 и *Pseudomonas fluorescens*. Антиплёночная активность повышалась с увеличением концентрации супернатанта. Образование биоплёнки различными штаммами тормозилось на 50%. При этом для золотистого стафилококка торможение образования биоплёнки составило 90%. Бактерицидного эффекта в отношении микроорганизмов *E.coli* и *P.fluorescens* не было.

Полисахарид, присутствующий в супернатанте, может изменить свойства абиотической или биотической поверхности. В таком случае или биоплёнка не будет образовываться, или адгезия будет значительно снижена. Авторы показали, что ингибирование образования плёнки *E.coli* подавляется при обработке лунок супернатантом на 92,5%, а сформировавшуюся плёнку полисахарид уменьшает на 75%.

В работе P. Jiang et al. [19] представлены антиплёночные эффекты экзополисахарида морской бактерии *Vibrio* QY101 [19]. Галофильные вибрионы являются автохтонными и аллохтонными представителями морских систем, но также часто обнаруживаются в устьях рек и пресных водоемах в ассоциированном виде с беспозвоночными. Штамм *Vibrio* QY101 был выделен из распадающегося слоевища морской бурой водоросли *Laminaria* sp. Экзополисахарид этого штамма (A101) ингибировал образование биоплёнки *P.aeruginosa*. Было сделано предположение, что это обусловлено действием альгинат-лиазы, которую продуцирует штамм. Однако очищенная альгинат-лиаза не обладала ингибирующим действием на образование биоплёнки синегнойной палочкой. Обработка надосадочной жидкости при помощи NaIO_4 привела к 60% снижению плёнокообразования, что свидетельствовало о полисахаридной природе действующего компонента. Преобладающими моносахаридами в полисахариде A101 были остатки глюкуроновой (21,47%), галактуроновой (23,05%) кислот, рамнозы (23,90%) и глюкозамина (12,15%). В небольших количествах в составе ПС присутствовали

остатки маннозы, глюкозы, галактозы и фукозы. Средняя молекулярная масса полисахарида составила 546 kDa. Бактерицидное действие у полисахарида отсутствовало. Ингибирование плёнокообразования полисахаридом A101 отмечено для целого ряда микроорганизмов, патогенных для человека и животных — синегнойной и кишечной палочек, золотистого и эпидермального стафилококка. Образование биоплёнки 12 из 15 граммотрицательных и 7 из 10 грамположительных микроорганизмов ингибировалось полисахаридом A101. При этом он не действовал на зрелые биоплёнки синегнойной палочки, в то время как на зрелую биоплёнку, образованную золотистым стафилококком, A101 оказывал выраженное действие. Эффективность сочетанного действия антибиотиков и полисахарида была значительно выше, чем эффект каждого из этих компонентов.

Как известно, взаимодействие бактерий и поверхности являются важным фактором для образования биоплёнки. При первичном прикреплении к абиотической поверхности синегнойной палочки, полисахарид A101 не оказывал никакого влияния. В таких же условиях адгезия золотистого стафилококка снижалась при дозе A101 100 мкг/мл. Таким образом, полисахарид из супернатанта микроорганизма *Vibrio* QY101 оказывал избирательное действие на адгезию микроорганизмов. Такие различия могут быть связаны с разным строением и структурой биопленок этих двух микроорганизмов.

Полисахарид A101 вмешивается и в межклеточные отношения в биоплёнке. Так, уже сформировавшиеся биоплёнки из планктонных *P.aeruginosa* значительно уменьшались в размерах в присутствии A101. В результате проведённых исследований авторы пришли к выводу, что полисахарид A101 может быть мощным терапевтическим средством при лечении синегнойной инфекции. Решающую роль в антиплёночной активности A101 авторы отводят анионным сахарам в составе A101, в частности, уроновым кислотам. Полный гидролиз A101 приводит к потере антиплёночной активности.

Таким образом, воздействие внеклеточного полисахарида вибриона может быть направлено на блокирование механизмов адгезии бактерий к поверхности, разрушение полимерного матрикса, нарушение связей между микроорганизмами и клетками. Эффективным оно может быть и в случае сочетания его с бактерицидными агентами, в частности, с антибиотиками.

О полисахаридной природе антибиоплёночных компонентов супернатантов морских бактерий сообщают и другие авторы. Известно, например, что морские бактерии, принадлежащие к роду *Pseudoalteromonas*, являются продуцентами соединений, представляющих большой интерес

для биотехнологии, в том числе для производства антибиоплёночных веществ. Показано, что супернатанты *Pseudoalteromonas haloplanctis* TAC 125 обладают антиплёночным действием в отношении *S.epidermidis*. Обработка супернатанта периодатом натрия позволила предположить полисахаридную природу биологически активного компонента супернатанта [20]. При работе с этим же штаммом установлено, что в супернатанте присутствуют также мелкие гидрофобные молекулы, играющие, по всей вероятности, сигнальную роль [21].

Полисахарид с уникальной структурой был выделен путём экстракции водно-фенольным методом из капсульной субстанции психрофильной морской бактерии *Colwellia psychrerythraea* 34 Н. Этот полисахарид состоит из тетрасахаридных повторяющихся единиц, содержащих два аминсахара и два остатка уроновой кислоты с треонином в качестве заместителя. Результаты исследования показали положительную корреляцию между структурой капсульного ПС и способностью этой бактерии колонизировать окружающую среду [22].

Значительный интерес представляет работа A. Spano et al. [23], в которой авторы описали антиплёночный эффект экзополисахарида термофильной бактерии *B.lichiniformis*, изолированной из гидротермального источника в Италии, который без бактерицидного эффекта ингибировал плёнокообразование мультирезистентными клиническими штаммами *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* на абиотических поверхностях. Молекулярная масса ЭПС составляла 1000 kDa [23].

В качестве примера антибиоплёночного действия цельных супернатантов и экстрактов морских бактерий также можно привести работу индонезийских учёных, получавших изоляты из донных морских отложений [24]. Всего ими было выделено 238 изолятов, 11 из которых обладали антиплёночной активностью по отношению к холерному вибриону. Три из них были высокоактивными. Генное секвенирование позволило определить вид микроорганизмов, полученных из морских отложений. Эти три изолята относились к следующим видам: *Pseudoalteromonas nigrifaciens* KMC10, *Exiguobacterium* sp. BMA1, а также *Vibrio gallicum*. Авторы отмечают перспективность данных изолятов в качестве основы для создания препаратов для лечения холеры.

Супернатанты каждого вида бактерий содержат разные антиплёночные молекулы, которые функционируют выборочно в зависимости от вида микроорганизма. Доказательством этого является работа R. Pira et al. [25], в которой авторы исследовали антибиоплёночный эффект супернатантов бактерий, адаптированных к холоду (да-

лее мы будем называть их полярными бактериями). Одной из стратегий выживания полярных бактерий в экстремальных условиях авторы считают производство метаболитов с антиплёночным действием, что используется микроорганизмами как оружие конкуренции с другими микроорганизмами за источники питания в экстремальной ситуации.

В ряде работ представлены результаты исследования антибиоплёночных свойств экстрактов и соединений, выделенных из бактерий — симбионтов различных морских беспозвоночных животных. Так, в работе A.Ahmad et al. [26] авторы исследовали антибиоплёночный эффект неочищенного экстракта морской бактерии *Pseudoalteromonas ruthenica*, выделенной из беспозвоночного животного Sea cucumber, по отношению к микроорганизмам *Serratia marcescens* и *Vibrio alginolyticus*. При этом авторы определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) экстракта относительно двух факторов вирулентности — способности к роению и продукции продигиозина. Было установлено, что продукция продигиозина снижалась на 72%, роение уменьшалось на 56,06%. Способность образовывать биоплёнку снижалась у *S.marcescens* и *V.alginolyticus* на 26,9 и 48,5% соответственно. Неочищенный экстракт был термостабилен [26].

Богатым источником микроорганизмов-симбионтов с антиплёночным потенциалом являются морские губки. В работе D. S. Trentin et al. [27] представлены результаты исследования антибиоплёночной активности фильтрата культуры морской грамотрицательной бактерии *Cobetia marina* — симбионта морской губки *Darwinella* sp. Тест-культуры — *S.aureus*, *S.epidermidis* были изолированы в клинике из венозных катетеров. Фильтрат этой бактерии на $84,7 \pm 3,4\%$ тормозил образование биоплёнки *S.epidermidis* и на $30 \pm 14,4\%$ — *P.aeruginosa*. Однако он не действовал на уже сформировавшуюся плёнку и не обладал антибактериальной активностью по отношению к этим микроорганизмам. Действие на биоплёнку *S.epidermidis* было дозозависимым. Автоклавирование фильтрата при 121°C в течение 15 мин не снижало эффекта [27].

В отношении механизма действия бактериальных ЭПС на биоплёнку существует несколько гипотез.

1. Действие ЭПС обусловлено конкурентным ингибированием мультивалентных углевод-белковых взаимодействий патогенов с клетками [28]. Антибиоплёночные ПС могут блокировать лектины или сахарсвязывающие белки, представленные на поверхности бактерий, или блокировать концевые адгезины фимбрий и пилей. Например, лектинзависимую адгезию патогенных бактерий *P.aeruginosa* к клеткам человека эффективно подавляет галактоманнан [29].

2. Некоторые исследования показывают, что ЭПС могут действовать как сигнальные молекулы, которые модулируют экспрессию генов бактерий-реципиентов [30].

3. Антибиоплёночные ЭПС могут также изменять физические свойства абиотических поверхностей [31]. Предварительная обработка таких поверхностей ЭПС снижает способность *E.coli*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *Enterococcus faecalis* образовывать пленки.

4. Антибиоплёночные ЭПС обладают способностью воздействовать на физические свойства поверхности бактериальных клеток. Например, ЭПС из *B.licheniformis* снижал гидрофобность клеточной поверхности *E.coli* [32]. Это приводило к снижению уровня адгезии бактериальных клеток и уменьшению аутоагрегации.

Заклячая изложенные выше материалы, касающиеся антибиоплёночных свойств экстрактов и ЭПС морских бактерий, следует отметить тот факт, что в настоящее время наблюдается очень высокий интерес ученых многих стран к этим объектам, и им предсказывают большое будущее в качестве основы для создания антибиоплёночных препаратов нового поколения с иным по сравнению с антибиотиками механизмом действия. Поскольку ЭПС морских бактерий не оказывают прямого бактерицидного эффекта на пленкообразующие бактерии, исчезает опасность высвобождения бактериальных токсинов и эндотоксинов, пагубно действующих на организм пациентов.

Антиадгезивные и антибиопленочные эффекты экстрактов и полисахаридов морских водорослей

Антиадгезивные свойства характерны и для сульфатированных ПС бурых, красных и зеленых водорослей. Эти соединения эффективно ингибируют контакт патогенов различных таксономических групп с эукариотическими клетками. Сравнительно недавно [33] были синтезированы протяжённые фрагменты молекул фукоиданов, которые являются потенциальными ингибиторами адгезии микроорганизмов. Первая серия соединений состояла из ди-, тетра-, гекса-, окта-, додека- и гексадекасахаридов, построенных из (1→3) связанных сульфатированных остатков α -L-фукопиранозы, которые соответствовали структуре полисахаридов, выделенных из водорослей *Saccharina latissima* и *Chorda filum*. Вторая серия компонентов представляла собой ди-, тетра- и гексасахариды, построенные из (1→3)- и (1→4)- связанных сульфатированных остатков α -L-фукопиранозы, подобные фрагментам фукоиданов из бурых водорослей *Fucus evanescens*, *Fucus distihus* и др.

Морская среда способствует формированию микробных биопленок практически на всех абиотических поверхностях. В то же время эукариотические организмы, особенно бентосные, как правило, свободны от обрастаний, поскольку в процессе эволюции они сформировали множество стратегий, направленных на предотвращение колонизации нежелательными микроорганизмами [34].

Сульфатированные ПС в отличие от ЭПС морских бактерий обладают прямым антимикробным действием [35, 36]. Таким образом, они, во-первых, могут предотвращать адгезию микроорганизмов на биотических и абиотических субстратах, во-вторых — оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие и, в-третьих — способны дестабилизировать уже сформировавшуюся биоплёнку.

Известно, что *Helicobacter pylori* может образовывать биоплёнку на поверхности слизистой желудка [37, 38]. Доказано, что образование биоплёнки хеликобактерами является важным фактором развития и устойчивости инфекции. J.M. Coticchia et al. [39] установили, что у пациентов с отрицательным результатом уреазного теста биоплёнка практически отсутствовала, в то время как на 97,3% уреазоположительных образцов слизистой (биопсийный материал) отмечалось заметное образование биоплёнки, т.е. образование биоплёнки сопряжено с более тяжелым течением инфекционного процесса.

Полисахариды из водорослей могут проявлять антибиопленочную активность [15]. Так, ПС из водорослей *Chlorella* и *Spirulina* подавляли адгезию *H.pylori* к клеткам слизистой желудка и муцину *in vitro* и тем самым предотвращали колонизацию и образование биоплёнки [40].

На примере микроорганизма *H.pylori*, который образует биоплёнку на слизистой желудка человека, рассмотрим антиадгезивный и антибиопленочный эффекты водорослевых ПС [38, 41]. *H.pylori* обладает большим набором факторов вирулентности (индукция воспаления желудка, разрушение слизистого барьера желудка, изменение гастрин-кислотного гомеостаза) и колонизации (подвижность, адаптивные ферменты и протеины, влияние на иммунитет). Основными мишенями для *H.pylori* в слизистой оболочке желудка являются эпителиоциты, нейроэндокринные клетки, лейкоциты и лимфоциты. Следует отметить и способность *H.pylori* к иммунному избеганию [42]. Пусковым фактором инфекционного процесса является адгезия *H.pylori* к мукоидным клеткам желудочного эпителия. Липидными рецепторами слизистой оболочки для *H.pylori* являются фосфатидилэтаноламин и ганглиотетрасил-церамид. Бактериальный адгезин, который распознает эти липиды, представляет собой S-подобный экзоним с М.м. 63 кДа. Благодаря спи-

ральной форме и жгутикам *H.pylori* осуществляется адгезия, в процессе которой также принимают участие особые факторы колонизации. В литературе достаточно часто обсуждается вопрос об эрадикации *H.pylori* и снижении воспалительного процесса, вызванного этим возбудителем, с помощью сульфатированных ПС из разных видов водорослей, поскольку они проявляют антиадгезивное действие и снижают интенсивность воспалительного процесса, подавляя образование провоспалительных цитокинов, продуцируемых клетками эндотелия слизистых [43]. Так, в экспериментах *ex vivo* у мышей с гастритом, вызванным *H.pylori*, при добавлении фукоидана в питьевую воду наблюдалось ослабление симптомов болезни. Фукоиданы, полученные из бурых водорослей *Cladosiphon okamuranus*, *F. evanescens* и *Fucus vesiculosus*, значительно подавляли процесс адгезии *H.pylori* к слизистой желудка [44]. Эффективность действия сульфатированных ПС определяет, по-видимому, pH содержимого желудка. Установлено, что фукоидан из бурой водоросли *C. okamuranus* ингибировал прикрепление *H.pylori* к слизистой желудка свиней при pH 2,0 и 4,0, а два других фукоидана, использованных в этих экспериментах, подавляли прикрепление возбудителя только при pH 2,0. Несульфатированные ПС — декстран и маннан — не обладали способностью подавлять адгезию *H.pylori* и не ингибировали адгезию возбудителя к муцину [43].

M. Nagaoka et al. [45], работая с фукоиданом из этого же вида водоросли *C. okamuranus*, показали, что возбудитель специфически узнает сфингогликолипиды, которые образуются сульфатированием остатков фукозы Levis b типа или H типа углеводных цепей и остатков галактозы, которые имеются на эпителиальных клетках хозяина. Фукоидан, как полимер с сульфатной группой, подавляет адгезию *H.pylori* к углеводной цепи. Авторы предполагают, что, так как поверхность клетки *H.pylori* покрывается фукоиданом, возбудитель теряет способность к адгезии на слизистой, а симптомы гастрита при этом затихают. Методом иммуно-блота показано, что слой белка на поверхности микроорганизма соединен с фукоиданом. Авторы обращают внимание на тот факт, что препараты с антиадгезивной активностью, в частности, фукоиданы, следует вводить перорально [45].

При сравнении способности различных сульфатированных ПС (гепарина, гепарансульфата и фукоидана) предотвращать адгезию *H.pylori* к макрофагам мышьяной линии клеток J774A.1 наиболее эффективным оказался фукоидан, подавляющий адгезию на 60—90% по сравнению с гепарином (30—60%). Авторы предлагают использовать фукоидан для лечения пациентов с хеликобактерной инфекцией [46].

Клинические исследования эффективности фукоидана были проведены у 60 пациентов с хеликобактерной инфекцией. Исследование продолжалось в течение 4 нед в условиях рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого эксперимента. Результаты показали, что после применения фукоидана число инфицированных лиц снизилось в большей степени по сравнению с группой, получавшей плацебо. В связи с этим авторы предлагают использовать полисахарид в качестве ингредиента продуктов функционального и диетического питания [47].

О. Renduelles et al. [15], обсуждая биологическую роль и потенциальное применение антиадгезионных полисахаридов в медицине, утверждают, что ПС могут подавлять образование биопленки или усиливать распад последней. Биополимеры конкурируют с бактериями и обеспечивают себе экологическое преимущество перед размножающимися микроорганизмами. Авторы считают антиадгезивные и антипленочные полисахариды весьма перспективными для создания на их основе новых эффективных препаратов [15].

Таким образом, действие водорослевых ПС на бактериальные пленки, в том числе и образующие *H. pylori*, является существенным механизмом защитного действия этих соединений.

Синергизм действия сульфатированных ПС с антибиотиками

Сульфатированные ПС, в частности, фукоиданы, могут действовать синергически с антибиотиками и работать как адъюванты, усиливая их действие. Так, К. Y. Lee et al. [48] исследовали действие фукоидана *per se* и в комплексе с антибиотиком (гентамицин) для борьбы с кариогенными и периодонтотгенными бактериями ротовой полости, которые, как правило, образуют биопленки. Установлено, что фукоидан может действовать на синтез клеточной стенки бактерий и в комбинации с антибиотиком в дальнейшем может применяться как средство против кариеса, периодонтита и других заболеваний ротовой полости, в том числе и в случае образования микроорганизмами биопленок [49]. Комбинация ПС с различными антибиотиками может усиливать ингибиторный эффект этих лекарственных средств. Так, например, при комбинации гентамицина с фукоиданом удалось снизить в 4 раза уровень минимальной ингибирующей концентрации (МИК) по отношению к *Streptococcus criceti* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, и также в 4 раза уровень минимальной бактерицидной концентрации (МБК) по отношению к *Streptococcus anginosus*, *A. actinomycetemcomitans* и *Prevotella intermedia*.

Этилацетатный экстракт бурой водоросли *Eisenia bicyclis* значительно уменьшал высокую

резистентность *Candida spp.* к флуконазолу. МИК флуконазола при комбинированном воздействии его с МИК этого экстракта (4 мг/мл) на *Candida spp.* снижалась от 64 до 4 мкг/мл, что позволяет говорить о синергизме действия компонентов экстракта и антибиотика и открывает перспективы получения из водорослей эффективных противогрибковых препаратов [50].

Вышеприведенные материалы свидетельствуют о том, что проблема синергизма действия существующих лекарственных препаратов антибиотиков и дериватов морских водорослей требует пристального внимания и углубленных исследований, так как это позволит найти подходы к совершенствованию терапии заболеваний, вызываемых бактериями и грибами, образующими биопленки в организме.

Полисахариды с антибактериальным, антиадгезионным и антибиопленочным эффектом, полученные из беспозвоночных животных

Достаточно много работ посвящено антибактериальному действию хитозана, полученного из головоногих моллюсков [51]. Хитозан представляет собой ПС, состоящий из β -(1 $\rightarrow$ 4) связанных остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. Этот ПС обычно получают из хитина, который обнаружен в разных биологических источниках, в том числе, в моллюсках. При этом выход хитозана из головоногих моллюсков значительно выше, чем из традиционного источника хитозана — краба [52]. Ранее уже сообщалось об антибактериальной активности β -хитозановых пленок, обладающих антибактериальными свойствами [53]. Образцы α и β хитозана с М.м. 10 kDa подавляли рост всех тест-микробов (грамотрицательных — *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157; грамположительных — *B. cereus*, *B. megaterium*, *S. aureus*, *S. epidermidis*) в дозах 0,005–0,018 мг/мл. Антибактериальную активность хитозана объясняют взаимодействием между положительно заряженным хитозаном (протонированная аминогруппа) и отрицательно заряженной бактериальной мембраной (ЛПС — в грамотрицательных и липотейхоевая кислота — в грамположительных бактериях). Это электрическое взаимодействие приводит к изменению проницаемости стенки микроба, что вызывает осмотический дисбаланс в бактерии и тем самым ингибирует рост микроорганизма. Кроме того, гидролиз пептидогликана в стенке микроорганизмов влечет за собой утечку внутриклеточных электролитов, например, ионов калия, и низкомолекулярных белковых компонентов (белки, нуклеиновые кислоты, лактатдегидрогеназа).

Другой механизм взаимодействия микроорганизмов и хитозана заключается в том, что гидро-

фильность моносахаридного пиранозного кольца хитозана способствует транслокации его внутрь гидрофобной хвостовой части липида [51]. В результате ингибируется синтез мРНК и белка бактерий. Вполне вероятно, что все описанные события происходят одновременно, но с разной интенсивностью.

Отмечены различия в антибактериальной активности в зависимости от олигомерности или полимерности хитозана из кальмара [54]. К полимерному хитозану были чувствительны *S. aureus*, *B. cereus* и *B. subtilis*, в то время как к олигомерному образцу полисахарида был чувствителен только *Vibrio parahaemolyticus*. Ни один из образцов хитозана в дозе 10 мг/кг не проявил токсического действия на эритроцитах человека и клетках НЕК 293.

Антибиоплёночные свойства хитозана, полученного из панцирей ракообразных, по отношению к *Candida albicans* показаны в работе E. Costa et al. [55], которые установили, что хитозан действует на планктонные формы *C. albicans*, подавляет адгезию (примерно на 95%) и образование пленки этим микроорганизмом (около 65%), а также тормозит образование пленки, содержащей *C. albicans* (на 70%). Авторы делают вывод, что хитозан, поскольку он действует на несколько этапов биоплёночного процесса, обладает большим потенциалом в качестве возможного агента для борьбы с пленками. Хитозан нетоксичен, обладает свойствами биосовместимости и биоразлагаемости [55].

Антибиоплёночное действие хитозана по отношению к *C. albicans* и *Candida parapsilosis* (выделены из катетера) представлено в работах [56–58].

Близкие результаты получены В. М. Бондаренко и др. [59]. Авторы показали, что ультразвуковые структурные изменения в клетках *Klebsiella pneumoniae* при воздействии хитозана проявлялись, в первую очередь, в нарушении целостности клеточной стенки. Деструкция клеточной стенки сопровождалась частичным отслоением наружной и цитоплазматической мембран, при этом возникали локальные расширения периплазматического пространства по всей поверхности клетки. Образование зон просветления в цитоплазме свидетельствовало о начальных этапах деструктивных изменений в белково-рибосомальном комплексе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70: 2: 267–274.
2. Голуб А.В. Бактериальные биоплёнки — новая цель терапии? *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2012; 14: 1: 23–29. / Golub A.V. Bakterial'nye biopljonki — novaja cel' terapii? *Klin mikrobiol antimikrob himioter* 2012; 14: 1: 23–29. [in Russian]
3. Доброхотский О.Н., Хомяков Ю.Н., Хомякова Т.И. Эпидемиологическое значение формирования биопленок в технических системах. Жизнь без опасностей. Здоровье Профилактика Долголетие 2009; 1: 78–80. / Dobrohot'skij O.N., Homjakov Ju.N., Homjakova T.I. Jepidemiologicheskoe znachenie formirovanija bioplenok v tehnikeskikh sistemah. Zhizn' bezopasnostej. Zdorov'e Profilaktika Dolgoletie 2009; 1: 78–80. [in Russian]

Для борьбы с биоплёнкой, образованной *P. aeruginosa*, авторы с положительным результатом использовали хитозановый гель с рН 4 или 6, который эффективно разрушал биоплёнку при вагинозе, при этом эффект не зависел от значения рН и плотности заряда на биополимере [60].

Заключение

В данном обзоре затронуты далеко не все вопросы, по которым в последние годы развивается поиск БАВ из морских гидробионтов, оказывающих ингибирующее действие на образование биопленок. Бактерии, продуцирующие антиадгезионные ПС, могут быть использованы в качестве пробиотиков, вытесняющих патогенные микроорганизмы. Полисахариды можно использовать также в качестве антиадгезивных покрытий в медицинских или промышленных устройствах.

Антибиоплёночные ПС из морских гидробионтов имеют такие положительные качества как биосовместимость и биоразлагаемость, что представляет большой интерес для медицинского и промышленного применения. Определение состава и структуры антибиоплёночных ПС позволит получать их в промышленном масштабе. В этом плане лучше всего дело обстоит с сульфатированными ПС бурых водорослей, поскольку структура многих из них установлена, и, как мы указывали выше, синтезированы фрагменты фукоиданов, обладающие антиадгезионными свойствами [33].

Не исключено, что для лечения пациентов с инфекциями, связанными с биоплёнками, требуется комплексное воздействие соединений не только полисахаридной, но и иной химической природы с другими механизмами действия, обладающих антиадгезивными, антивирулентными, бактериостатическими или бактерицидными функциями. Такая смесь должна быть безвредной, а её отдельные компоненты не должны инактивировать друг друга [4]. Мы имеем все основания полагать, что основой для создания таких поливалентных препаратов могут послужить биологически активные вещества углеводной природы из морских гидробионтов.

4. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стратегия управления бактериальным биопленочным процессом. *Журнал инфектологии* 2012; 4: 3: 5–15. / Majanskij A.N., Chebotar' I.V. Strategija upravlenija bakterial'nym bioplenochnym processom. *Zhurnal infektologii* 2012; 4: 3: 5–15. [in Russian]
5. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции. *Журнал инфектологии* 2010; 2: 3: 4–15. / Gostev V.V., Sidorenko S.V. Bakterial'nye biopljonki i infekcii. *Zhurnal infektologii* 2010; 2: 3: 4–15. [in Russian]
6. Krachler A.M., Orth K. Targeting the bacteria-host interface Strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence* 2013; 4: 4: 284–294.
7. Aronson M., Medalia O., Schori L., Mirelman D., Sharon N., Ofek I. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. *J Infect Dis* 1979; 139: 3: 329–332.

8. Barghouthi S., Guerdoud L.M., Speert D.P. Inhibition by dextran of *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1996; 154: 6: 1788–1793.
9. Elliot T.S.J., Curran A. Effects of heparin and chlorbutol on bacterial colonisation of intravascular cannulae in an *in vitro* model. J Hosp Infect 1989; 14: 193–200.
10. Klemm P., Vejborg R.M., Hancock V. Prevention of bacterial adhesion. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 88: 451–459.
11. Tran V.B., Fleiszig S.M., Evans D.J., Radke C.J. Dynamics of flagellum- and pilus-mediated association of *Pseudomonas aeruginosa* with contact lens surfaces. Appl Environ Microbiol 2011; 77: 11: 3644–3652.
12. Mintzer M.A., Dane E.L., O'Toole G.A., Grinstaff M.W. Exploiting dendrimer multivalency to combat emerging and reemerging infectious diseases. Mol Pharm 2012; 9: 3: 342–354.
13. Tseng Y.T., Chang H.T., Chen C.T., Chen C.H., Huang C.C. Preparation of highly luminescent mannose-gold nanodots for detection and inhibition of growth of *Escherichia coli*. Biosens Bioelectron 2011; 27: 1: 95–100.
14. Nicholson T.L., Shore S.M., Smith T.C., Fraena T.S. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolates of swine origin form robust biofilms. PLOS ONE 2013; 8: 8: e73376.
15. Rendueles O., Kaplan J.B., Ghigo J.M. Antibiofilm polysaccharides. Environ Microbiol 2013; 15: 2: 334–346.
16. Bakkiyaraj D., Pandian S.K. *In vitro* and *in vivo* antibiofilm activity of a coral associated actinomycete against drug resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. Biofouling 2010; 26: 6: 711–717.
17. Nithya C., Devi M.G., Pandian S.K. A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in Gram-positive and Gram-negative species. Biofouling 2011; 27: 5: 519–528.
18. Abu Sayem S.M., Manzo E., Ciavatta L., Tramice A., Cordone A., Zanfardino A. et al. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. Microbial Cell Factories 2011; 10: 74–78.
19. Jiang P., Li J., Han F., Duan G., Lu X., Gu Y., Yu W. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. Plos One 2011; 6: 4: e18514.
20. Papa R., Parrilli E., Sannino F., Barbato G., Tutino M.L., Artini M. et al. Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. Res Microbiol 2013; 164: 5: 450–456.
21. Parrilli E., Papa R., Carillo S., Tilotta M., Casillo A., Sannino F. et al. Anti-biofilm activity of *Pseudoalteromonas haloplanktis* tac125 against *Staphylococcus epidermidis* biofilm: Evidence of a signal molecule involvement? Int J Immunopathol Pharmacol 2015; 28: 1: 104–113.
22. Carillo S., Casillo A., Pieretti G., Parrilli E., Sannino F., Bayer-Giraldi M. et al. A unique capsular polysaccharide structure from the psychophilic marine bacterium *Colwellia psychrerythraea* 34H that mimics antifreeze (Glyco) proteins. Am Chem Soc 2015; 137: 1: 179–189.
23. Spanò A., Laganà P., Visalli G., Maugeri T.L., Gugliandolo C. *In vitro* antibiofilm activity of an exopolysaccharide from the marine thermophilic *Bacillus licheniformis* T14. Curr Microbiol 2016; 72: 5: 518–528.
24. Waturangi D.E., Bunardi Y.A., Magdalena S. Antibiofilm activity of bacteria isolated from marine environment in Indonesia against *Vibrio cholerae*. Research Journal of Microbiology 2011; 6: 926–930.
25. Papa R., Selan L., Parrilli E., Tilotta M., Sannino F., Feller G. et al. Antibiofilm activities from marine cold adapted bacteria against *Staphylococci* and *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol 2015; 6: 1333: Published online Dec 14: doi:10.3389/fmicb.2015.01333.
26. Ahmad A., Sulieman M. F. I., Usup G. Anti-biofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas rutenica* KLPp3 against *Serratia marcescens* and *Vibrio alginolyticus*. Malaysian Journal of Microbiology 2016; 12: 1: 30–34.
27. Trentin D.S., Gorziza D.F., Abraham W.R., Antunes A.L.S., Lerner C., Mothes B. et al. Antibiofilm activity of *Cobetia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates. Braz J Microbiol 2011; 42: 4: 1329–1333.
28. Wittschier N., Lengsfeld C., Vorhies S., Stratmann U., Ernst J.F., Verspohl E.J. et al. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. J Pharm Pharmacol 2007; 59: 6: 777–786.
29. Zinger-Yosovich K.D., Gilboa-Garber N. Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* and *Ralstonia solanacearum* lectins by plant and microbial branched polysaccharides used as food additives. J Agric Food Chem 2009; 57: 15: 6908–6913.
30. Kim Y., Oh S., Kim S.H. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Biochem Biophys Res Commun 2009; 379: 2: 324–329.
31. Valle J., Da Re S., Henry N., Fontaine T., Balestrino D., Latour-Lambert P. et al. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 33: 12558–12563.
32. Sayem S.A., Manzo E., Ciavatta L., Tramice A., Cordone A., Zanfardino A. et al. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. Microbial Cell Factories 2011; 10: 74: doi:10.1186/1475-2859-10-74.
33. Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Nifantiev N.E. Synthesis of low-molecular-weight carbohydrate mimetics of heparin. Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2011; 37(6): 672–706.
34. Wahl M., Goecke F., Labes A., Dobretsov S., Weinberger F. The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. Front Microbiol 2012; 3: 292: 20–21. doi:10.3389/fmicb.2012.00292.
35. Marudhupandi T., Thangappan T., Kumar A. Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. Int Current Pharmaceutical J 2013; 2: 10: 156–158.
36. Busetti A., Thompson T.P., Tegazzini D., Megaw J., Maggs C.A., Gilmore B.F. Antibiofilm activity of the brown alga *Halidrys siliquosa* against clinically relevant human pathogens. Mar Drugs 2015; 13: 6: 3581–3605.
37. Cellini L., Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Di Giulio M., Traini T. et al. Characterization of an *Helicobacter pylori* environmental strain. Journal of Applied Microbiology 2008; 105: 761–769.
38. Cammarota G., Sanguinetti M., Gallo A., Posteraro B. Review article: biofilm formation by *Helicobacter pylori* as a target for eradication of resistant infection. Aliment Pharmacol Ther 2012; 36: 222–230.
39. Coticchia J.M., Sugawa C., Tran V.R., Gurrola J., Kowalski E., Carron M.A. Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease. J Gastrointest Surg 2006; 10: 6: 883–889.
40. Loke M.F., Lui S.Y., Ng B.L., Gong M., Ho B. Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50: 231–238.
41. Kalali B., Mejias-Luque R., Javaheri A., Gerhard M. *H.pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. Mediators of Inflammation 2014; Article ID 426309, 9 pages. doi: 10.1155/2014/426309.
42. Fehlings M., Drobbe L., Moos V., Renner Viveros P., Hagen J., Beigier-Bompadre M. et al. Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. Infect Immun 2012; 80: 8: 2724–2734.
43. Shibata H., Iimuro M., Uchiya N., Kawamori T., Nagaoka M., Ueyama S. et al. Preventive effects of *Cladosiphon fucoidan* against *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. Helicobacter 2003; 8: 1: 59–65.
44. Shibata H., Kimuratakagi I., Nagaoka M., Hashimoto S., Sawada H., Ueyama S. et al. Inhibitory effect of *Cladosiphon fucoidan* on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 1999; 45: 3: 325–336.
45. Nagaoka M., Shibata H., Takagi I., Aiyama R., Hashimoto S. Effect of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* (Okinawa Mozuku) on the eradication of *Helicobacter pylori*. Cell (Tokyo) 2005; 37: 10: 30–33.
46. Lutau N., Nilsson I., Wadstrom T., Ljungh A. Effect of heparin, fucoidan and other polysaccharides on adhesion of enterohepatic *Helicobacter* species to murine macrophages. Appl Biochem Biotechnol 2010; 19: 1–18.
47. Back H.I., Kim S.Y., Park S.H., Oh M.R., Kim M.G., Jeon J.Y. et al. Effects of fucoidan supplementation on *Helicobacter pylori* in humans. FASEB J 2010; 24: 1: Suppl. Ib 347.
48. Lee K.Y., Jeong M.R., Choi S.M., Na S.S., Cha J.D. Synergistic effect of fucoidan with antibiotics against oral pathogenic bacteria. Archives of Oral Biology 2013; 58: 5: 482–492.
49. Pierre G., Sopena V., Juin C., Mastouri A., Graber M., Maugard T. Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. Biotechnology and Bioengineering 2011; 16: 5: 937–945.
50. Kim K.H., Eom S.H., Kim H.J., Lee D.S., Nishimiyumukiza O., Kim D. et al. Antifungal and synergistic effects of an ethyl acetate extract of the edible brown seaweed *Eisenia bicyclis* against *Candida* species. Fisheries and aquatic sciences 2014; 17: 2: 209–214.
51. Park S.C., Nam J.P., Kim J.H., Kim Y.M., Nah J.W., Jang M.K. Antimicrobial action of water-soluble β -chitosan against clinical multi-drug resistant bacteria. Int J Mol Sci 2015; 16: 7995–8007.
52. Jothi N., Kunthavai Nachiyar R. Isolation and identification of chitin and chitosan from cuttle bone of *Sepia prashadi* Winckworth. Int j curr sci 2014; 11: E18–25.
53. Zhong Z., Aotegen B., Xu H., Zhao S. Structure and antimicrobial activities of benzoyl phenyl-thiosemicarbazone-chitosans. Int J Biol Macromol 2012; 50: 4: 1169–1174.
54. Sukmark T., Rachtanapun P., Rachtanapun C., Rachtanapun C. Antimicrobial activity of oligomer and polymer from different sources against foodborne pathogenic bacteria. Natural Science 2011; 45: 4: 636–643.

55. Costa E., Silva S., Tavaría F., Pintado M. Antimicrobial and antibiofilm activity of chitosan on the oral pathogen *Candida albicans*. *Pathogens* 2014; 3: 908–919.
56. Carlson R.P., Taffs R., Davison W.M., Stewart P.S. Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 2008; 19: 8: 1035–1046.
57. Martinez L.R., Mihu M.R., Tar M., Cordero R.J.B., Han G., Friedman A.J. et al. Demonstration of antibiofilm and antifungal efficacy of chitosan against candidal biofilms, using an *in vivo* central venous catheter model. *J. Infect Dis* 2010; 201: 9: 1436–1440.
58. Silva-Dias A., Palmeira-de-Oliveira A., Miranda I.M., Branco J., Cobrado L., Monteiro-Soares M. et al. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida species*. *Med Microbiol Immunol* 2014; 203: 1: 25–33.
59. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В., Вербицкая Н.Б., Антонов С.Ф. Воздействие хитозана на ультраструктуру клеток патогенных и условно-патогенных микроорганизмов // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы Восьмой Международной конференции. М.: Изд-во ВНИРО 2006; 175–179. / Bondarenko V.M., Rybal'chenko O.V., Verbitskaja N.B., Antonov S.F. Vozdejstvie hitozana na ul'trastrukturu kletok patogennyh i uslovno-patogennyh mikroorganizmov // Sovremennye perspektivy v issledovanii hitina i hitozana: Materialy Vos'moj Mezhdunarodnoj konferencii. M.: Izd-vo VNIRO 2006; 175–179. [in Russian]
60. Kandimalla K.K., Borden E., Omtri R.S., Boyapati S.P., Smith M., Lebby K. et al. Ability of chitosan gels to disrupt bacterial biofilms and their applications in the treatment of bacterial vaginosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 102: 7: 2096–2101.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Беседнова Наталья Николаевна — академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток

Макаренкова Илона Дамировна — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток

Звягинцева Татьяна Николаевна — д.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории химии ферментов ТИ-БОХ ДВО РАН, Владивосток

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д.м.н., зав. лабораторией иммунологии «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток

Запорожец Татьяна Станиславовна — д.м.н., заместитель директора по научной работе «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», Владивосток

Антибактериальная терапия чумы. Исторический срез и взгляд в будущее

И. А. ЩИПЕЛЕВА, Е. И. МАРКОВСКАЯ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону

Plague Antibacterial Therapy. Historical Aspects and Future Prospects

I. A. SCHIPELEVA, E. I. MARKOVSKAYA

Rostov-on-Don Research Antiplague Institute, Rostov-on-Don

Обзорная статья включает анализ заболеваемости чумой в мире, сопредельных государствах и в России за последние 25—30 лет, а также современное состояние этой проблемы. Представлен исторический путь развития антибактериальной терапии, экспериментальные данные и клинические наблюдения. Описан феномен возникновения антибиотикорезистентности и пути его преодоления. Показана актуальность вопроса в наши дни в связи с миграционными процессами и угрозой биотерроризма. Обозначены дальнейшие перспективы научного подхода к решению вопросов антибактериальной терапии чумной инфекции.

Ключевые слова: чума, вирулентность, антибиотики, резистентность, лечение.

The review includes the analysis of plague incidence throughout the world, in Russia and neighboring countries within the last 25—30 years, as well as the current state of the problem. The historical development of antibacterial therapy, experimental data and clinical observations are presented. The phenomenon of emergence of antibiotic resistance is described along with proposed ways of its prevention. The urgency of the problem nowadays is shown in regard to migration events and bioterrorism threat. Further perspectives are outlined for scientific approaches to solution of the problems of antibacterial therapy of plague infection.

Key words: plague, virulence, antibiotics, resistance, therapy.

Анализ заболеваемости чумой в мире за последние 25—30 лет свидетельствует о неблагоприятном прогнозе в отношении этой высококонтагиозной, карантинной инфекции. С 1990 по 1999 гг. число заболевших увеличилось более чем в 2 раза, при этом заболеваемость и смертность в основном приходились на страны Африки, прежде всего, на о. Мадагаскар, где с 1990 г. регистрировали число случаев заболевания от 600 до 1500 в год, а летальность составляла 10,5 % [1, 2].

В последние годы ежемесячная информация ФКУЗ «Противочумный центр» на сайте Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, подготовленная по данным ProMED-mail Международного общества по проблемам инфекционных болезней, свидетельствует о ежегодной регистрации 200—300 случаев эпидемиологических осложнений, обусловленных возникновением бубонной чумы, которая при отсутствии специфического лечения антибиотиками, спон-

танно переходит в лёгочную или септическую форму с высоким показателем летальности, а в отсутствии лечения является фатальной и может привести к смерти больного в течение 24 ч.

С 2004 по 2013 гг., по данным ВОЗ, в 16 странах Азии, Африки и Америки зарегистрировано 13377 случаев заболевания чумой. Наиболее неблагоприятными в этом плане странами являются Демократическая республика Конго, Мадагаскар, Мозамбик, Уганда, Танзания, Республика Казахстан, Республика Туркменистан, Республика Узбекистан, Монголия, Китай, Индия. Самые высокие показатели заболеваемости чумой в мире (97,6% от общего числа больных) отмечаются в Африке. В 2004—2005 гг. в Демократической Республике Конго заболели 135 человек, в 2006 году — 194 [2]. Летом 2009 г. сообщалось о вспышке лёгочной чумы на Северо-Западе Китая [3]. В сентябре 2010 г. в Тибете 5 больных заболели лёгочной чумой [4].

В настоящее время военные конфликты катастрофически увеличили поток мигрантов из Африки, которые штурмуют европейские страны. Этот процесс в разы увеличил риски завоза особо опасных болезней, в том числе чумы.

© И. А. Щипелева, Е. И. Марковская, 2016

Адрес для корреспонденции: 690087, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д.117/40. Ростовский-на-Дону НИ противочумный институт

Чрезвычайно остро стоит проблема биотерроризма и вероятность использования чумного микроба в качестве биоагента [5, 6].

Эпизоотическая активность природных очагов сохраняется и на территории Российской Федерации, что привело в сентябре 2014 года к случаю заражения чумой человека в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге [7].

Среднестатистическая смертность от чумы не снижается (10—15%), даже при наличии высокоэффективных средств этиотропной терапии. Начало вспышек характеризуется 100% летальностью, что связано с внезапностью болезни и отсутствием должной готовности лечебно-профилактических учреждений [8].

Высокая контагиозность и смертность от чумы заставляли врачей постоянно искать средства ее профилактики и лечения. В доантибиотическую эру эти попытки были малоэффективны. Если при бубонной форме чумы некоторые больные выздоравливали, то заболевание, протекавшее в виде пневмонии или сепсиса, до 40-х гг. XX столетия всегда оставалось неизлечимым [9]. С 1939 г. с разной эффективностью для лечения чумы начали использовать сульфаниламидные препараты. Суммируя результаты лечения сульфаниламидами разных форм заболевания, был сделан вывод, что эта группа препаратов достаточно эффективна лишь в случаях профилактического лечения контактных [9]. В то же время есть сообщения об успешном применении пролонгированных сульфаниламидов при лечении чумы во Вьетнаме [10]. Касаясь современного состояния вопроса об использовании уже новых пролонгированных форм сульфаниламидов, используемых в фиксированной комбинации с триметопримом, некоторые специалисты считают триметоприм/сульфаметоксазол препаратом второго порядка, другие рекомендуют его только для целей экстренной профилактики [6, 11]. Триметоприм / сульфаметоксазол (бактрим, бисептол, ко-тримоксазол и др.) и триметоприм / сульфоамометоксин (сульфатон) рекомендованы для экстренной профилактики чумы [12]. Однако во время вспышки чумы в Танзании в 1991 г. все изученные штаммы, сохранившие чувствительность к стрептомицину, тетрациклину, хлорамфениколу, были устойчивы к триметоприму [13].

Успешное лечение не только бубонной, но и легочной, септической и других форм чумы оказалось возможным только после открытия антибиотиков, в частности, стрептомицина в 1944 г. Внедрение в практику лечения чумы стрептомицина, тетрациклина, хлорамфеникола, а впоследствии и других антибиотиков сыграло решающую роль в резком сокращении числа заболеваний и снижении смертности. Оценка активности стрептомицина впервые была проведена в 1944 г. в

опытах на белых мышах. В 1946 г. стрептомицин был введен в практику лечения больных с разными клиническими формами чумы, включая легочную и септическую, что показано в публикациях и монографиях многих авторов [6, 9, 11]. Отмечена также высокая эффективность стрептомицина при предупредительном лечении людей, находившихся в контакте с больными чумой [11].

Результаты изучения активности стрептомицина при экспериментальной чуме у белых мышей, морских свинок и обезьян полностью коррелировали с данными клинических наблюдений. При этом эффективность антибиотика регистрировали как при подкожном, так и аэрогенном (интратрахеальном) заражении животных, т. е. при моделировании первичной легочной чумы [14, 15].

Несмотря на высокую эффективность стрептомицина, массированное его применение почти сразу же привело к случаям выделения от больных штаммов возбудителя, устойчивых к действию этого антибиотика [16]. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* было показано, что стрептомицино-резистентные мутанты (Str^r) возникают с высокой частотой при однократном воздействии антибиотика. Уровень их устойчивости значительно превосходит концентрации антибиотика в питательной среде и те максимальные концентрации, которые могут быть созданы в жидкостях и тканях макроорганизма при лечении даже субтоксическими дозами препарата. При этом многие мутанты, тем более выделенные от животных, сохраняли исходный уровень вирулентности [17].

Появление и внедрение в практику тетрациклина и хлорамфеникола (левомицетина) позволило клиницистам с успехом использовать комбинации стрептомицина с этими антибиотиками при лечении чумы, при этом была показана эффективность и монотерапии этими антибиотиками [11, 18].

Эффективность препаратов группы тетрациклинов (в частности пролонгированных — доксициклина, метациклина и др.) была показана в экспериментах на белых мышах, инфицированных не только подкожно, но и аэрогенно [19]. Несмотря на успешное применение в клинике этих препаратов, периодически появляются сообщения о выделении не только стрептомицино-резистентных, но и тетрациклинорезистентных штаммов чумного микроба от людей и крыс. Так, при изучении чувствительности к антибиотикам 277 штаммов чумного микроба, выделенных от людей на о. Мадагаскар, 13% оказались устойчивыми к тетрациклину [16].

Во время вспышки чумы в Танзании при легочной форме инфекции возбудитель удавалось высевать из мокроты больных на фоне лечения тетрациклином и комбинацией стрептомицина с тетрациклином [13]. Этот регион может стать ис-

точником инфекции, вызываемой антибиотикорезистентными штаммами возбудителя, от завоза которой при возможностях современного транспорта не застрахована ни одна страна мира.

Помимо стрептомицина, высокой химиотерапевтической активностью при экспериментальной чуме обладают и другие представители группы аминогликозидов — гентамицин, сизомицин, амикацин и др. [15, 20—22]. Достойное место в этом ряду занял изепамицин, что было показано как в профилактике, так и при лечении на модели белых мышей [23]. При лечении чумы в клинике с успехом использовали мономицин (паромомицин), канамицин, гентамицин [11, 24].

При экспериментальной чуме белых мышей и обезьян, заражённых как подкожно, так и аэрогенно, доказана высокая эффективность рифампицина [21, 22, 25]. Однако монотерапия рифампицином, как и в случае применения одного стрептомицина, может быть осложнена появлением рифампицинорезистентных мутантов (Rif^r) с исходным уровнем вирулентности [26]. Так, из изученных *in vitro* 92 штаммов чумного микроба 20% оказались устойчивыми к рифампицину [27]. При этом особую настороженность вызывают наблюдения о том, что Rif^r мутанты становятся более активными реципиентами R-плазмид множественной лекарственной устойчивости при использовании рифампицина в качестве агента контрселекции донора [28].

Естественно, что не были обойдены вниманием и представители группы бета-лактамов. И если первый представитель этой группы антибиотиков — пенициллин не был эффективен при экспериментальной чуме, то полусинтетический представитель бета-лактамов — ампициллин оказался высокоэффективным препаратом в профилактике и лечении чумы [29]. Ампициллин был с успехом применен и для лечения бубонной формы чумы у человека [24].

В дальнейшем в условиях эксперимента была показана перспективность использования для лечения чумы и других представителей бета-лактамов — азлоциллина [30], азтреонама [31], цефалоспоринов III—IV поколений — цефоперазона, цефотаксима, цефтазидима, цефтриаксона, цефиксима и цефепима [21, 22, 32].

Карбапенемы (меропенем, имипенем) не имеют преимуществ перед ампициллином, поэтому включение их в арсенал средств этиотропной терапии чумы нецелесообразно [33].

Еще в 70-х гг. прошлого столетия была показана активность *in vitro* и *in vivo* первого представителя хинолонов — налидиксовой кислоты. Однако имеются данные о высокой частоте появления устойчивых к налидиксовой кислоте мутантов чумного микроба (Nal^r) при сохранении ими высокой степени вирулентности. Оказалось,

что Nal^r мутация носит одноступенчатый характер, а степень резистентности достигает высоких цифр [26].

Более перспективными являются представители новой группы хинолонов — фторхинолоны (ципрофлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин), которые целесообразно применять в максимальных терапевтических дозах и курсом не менее 7—10 дней [21, 22, 26, 34]. Высокая эффективность фторхинолонов, в частности цiproфлоксацина, в экспериментах с подкожным и аэрогенным заражением животных доказана и зарубежными исследователями [15]. Имеются сообщения об успешном применении цiproфлоксацина при лечении чумы у людей [11]. Перспективными оказались и представители III—IV поколения фторхинолонов — ломефлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин, которые обеспечивали 90—100% выживаемость заражённых животных в эксперименте. [35]. Левофлоксацин эффективно излечивал устойчивую форму лёгочной чумы на модели африканских зелёных мартышек, что позволило сделать заключение о возможности применения данного препарата в качестве первого профилактического средства и антибиотика широкого профиля в случае актов биотерроризма при отсутствии возможности идентификации патогенного микроба [36].

В то же время, показано отсутствие эффективности фторхинолонов при экспериментальной чуме белых мышей, вызванной возбудителем, устойчивым к налидиксовой кислоте [26], что ещё раз свидетельствует о нецелесообразности использования налидиксовой кислоты в монотерапии.

Наиболее эффективным способом предотвращения развития хромосомной устойчивости к антибактериальным препаратам у возбудителей инфекционных заболеваний является использование их в комбинациях, позволяющее не только значительно снизить частоту появления мутантов, но и повысить эффективность этиотропной терапии за счёт синергидного характера взаимодействия используемых для комбинированной терапии препаратов. Так, доказана высокая эффективность комбинаций рифампицина и фторхинолонов с бета-лактамами и аминогликозидами [37], что показано и при лечении больных чумой [38, 39]. Клинический опыт лечения больных лёгочной чумой, приобретённый в сентябре 2010 г. в Тибете, позволяет рекомендовать комбинацию стрептомицина с фторхинолонами в качестве «золотого стандарта» [4].

Лечение чумы в настоящее время может осложниться распространением множественноустойчивых форм возбудителя. Способность чумного микроба воспринимать и экспрессировать R-плазмиды в экспериментах доказана давно и

многими исследователями. Однако возможность возникновения и распространения таких форм возбудителя в природе показана лишь в 1997 г., когда от двух больных бубонной формой чумы на о. Мадагаскар были выделены штаммы, антибиотикорезистентность которых была детерминирована R-плазмидами [40]. Обе охарактеризованные R-плазмиды не влияли на вирулентность чумного микроба, при этом одна из них массой 150 кв inc C — группы несовместимости кодировала резистентность к стрептомицину, канамицину, тетрациклину, хлорамфениколу, сульфаниламидам, ампициллину т.е. к препаратам, используемым для профилактики и лечения чумы; другая была отнесена к inc P — группе несовместимости (40 кв) и кодировала резистентность к стрептомицину. Происхождение R⁺ штаммов чумного микроба осталось неустановленным, однако их появление в естественных условиях вызывает серьёзную озабоченность в связи с реальной угрозой их повсеместного распространения [41].

Эффективность этиотропной терапии зависит от своевременно начатого адекватного лечения. Поздняя диагностика инфекции, даже несмотря на применение высокоактивных антибактериальных препаратов и интенсивной патогенетической терапии, на фоне генерализации процесса не исключает летального исхода, о чём свидетельствует сохранение высокого процента смертности при чуме [38].

Сравнительное изучение эффективности большого набора антибактериальных средств в экспериментах на мышах, заражённых подкожно и аэрогенно, подтвердило высокую эффективность этиотропной терапии при раннем (через 24 ч после заражения) и низкую — при позднем начале лечения (через 48 и 72 ч) [15]. Авторы показали, что большей терапевтической активностью при позднем начале лечения обладали аминогликозиды и фторхинолоны (но не более 60% выживших животных).

Повышению эффективности этиотропной терапии, начатой в поздние сроки после инфицирования, способствует одновременное введение γ -глобулина, моноклональных антител к антигенам чумного микроба или иммунизация антибиотикорезистентным штаммом [42, 43]. Кроме того, показано, что применение антибиотиков одновременно с иммунизацией устойчивым к ним штаммом чумного микроба обеспечивает достаточную степень эффективности даже при заражении резистентным к этим препаратам вирулентным штаммом возбудителя, что создаёт резерв времени для определения антибиотикограммы возбудителя с последующим переходом на высокоэффективный антибактериальный препарат [43].

В связи с тем, что рекомендованные для лечения чумы антибактериальные препараты не имели характеристики по их способности усиливать или не утяжелять развитие инфекционно-токсического шока, была изучена клиническая эффективность антибактериальных препаратов разных групп с использованием инфекционно-токсической модели чумы у белых мышей [44]. На «Способ прогнозирования клинической эффективности антибактериальных, вакцинных препаратов, средств пассивной антитоксической иммунотерапии на модели инфекционно-токсической чумы у белых мышей» был получен патент [45]. Полученные результаты экспериментов свидетельствуют о том, что аминогликозиды являются основной группой препаратов, эффективных при чумной инфекции. Стрептомицин остаётся эталонным препаратом, с которым сравнивают эффективность других. Показана перспективность применения на стадии развивающегося (развившегося) инфекционно-токсического шока нетилмицина [46], ципрофлоксацина и моксифлоксацина [47]. В то же время, терапевтическая эффективность гентамицина, рекомендованного для профилактики и лечения всех форм чумы, резко снижалась на модели инфекционно-токсической формы инфекции, что делает нецелесообразным его использование на поздних стадиях заболевания [46].

Драматическое нарастание антибиотикорезистентности и значительное сокращение процесса наработки и внедрения новых антибиотиков требует расширения арсенала средств. Результатом многолетней работы в этом направлении, после огромного количества проведённых экспериментов, стали разработанные схемы рационального применения антибактериальных препаратов и их комбинаций для экстренной профилактики и лечения чумы, которые включены в методические указания федерального уровня [12].

Рассматривая перспективу дальнейших тенденций в антибактериальной терапии чумы, можно обозначить большой пул интересных направлений. Прежде всего, это изучение новых антибактериальных препаратов. Многообещающее будущее сулят учёные пенибактерину, новому липопептидному антибиотику, активному в отношении устойчивых к антибиотикам штаммов разных групп микроорганизмов [48], и аминогликозиду нового поколения — плаздомицину, устойчивому к действию аминогликозид-модифицирующих ферментов, активному в отношении разнообразной коллекции грамотрицательных бактерий [49]. Также высокую оценку для лечения чумы получил новый антибиотик класса кетолидов — цетромицин [50]. Разработана интересная схема лечения экспериментальной чумы липосомальными формами антибиотика цефепима и имунофана, обеспечившая практически 100% выживаемость животных [51].

Добавление полиоксидония в схему лечения антибиотиками генерализованной стадии инфекционного процесса при чуме повышает выживаемость белых мышей, увеличивает продолжительность их жизни [52].

Другой путь связан с перспективой фаговой терапии в комбинации с антибиотиками. Есть сведения, что биоинженерные фаги решили многие проблемы традиционной фаговой терапии, как-то: «адресную» доставку лекарств и обратимость лекарственной устойчивости бактерий [53]. В качестве альтернативной стратегии лечения инфекции разработана структурная инженерия фаголизина, оказывающего бактерицидное действие на грамотрицательные патогены. Гибридный токсин специфично поражает *Yersinia pestis* [54].

Есть перспективы использования авибактама — не бета-лактаминового ингибитора широкого круга бета-лактамаз, который обеспечивает активность бета-лактамов при устойчивости, опосредованной ферментами класса C и представляющей нарастающую проблему как при госпитальных, так и внебольничных инфекциях [55].

Существует возможность повышения антибактериальной активности при комбинации антибиотиков с антимикробными пептидами человека, под действием которых в клеточных стенках бактерий происходит пертурбация мембран или образование пор, что усиливает проникновение антибиотиков внутрь клетки и повышение антибактериального эффекта. Этот комбинированный метод рассматривается как новая стратегия усиления активности антибиотиков [56].

Имеются сообщения о перспективности применения антиадгезивных средств в терапии инфекционных заболеваний, в том числе чумы [57].

Можно искать подходы, используя биологический феномен бактериоциногенности, то есть синтез бактериями высокомолекулярных антибиотиков — бактериоцинов, веществ белково-пептидной природы, убивающих родственные

виды или штаммы, тормозящие их рост. *Y.pestis* вырабатывает пестицины, которые с помощью генетической инженерии нужно направить на уничтожение себе подобных вирулентных, вызывающих болезнь [58].

Исследован потенциал вирулентности штамма *Y.pestis* в условиях модельной микрогравитации, установлено снижение индуцированной HeLa-клетками цитотоксичности. Новое понимание патогенеза бактериемии позволит определить новые цели для разработки антимикробных препаратов, а также потенциальных живых аттенуированных вакцин [59].

На основе анализа метаболического пути MtrE-лигазы, являющейся одним из слабых ферментов-мишеней *Y.pestis*, показана возможность определять мишень потенциального лекарственного препарата, что облегчает разработку новых противомикробных средств [60].

Для защиты населения и противодействия биологическим угрозам — одного из важнейших направлений государственной политики в области национальной безопасности Российской Федерации нашим учёным предстоит дальнейшая большая экспериментальная работа по этим и другим направлениям, способствующим эрадикации возбудителя чумы при возникновении инфекции в любых её проявлениях.

Авторы выражают искреннюю признательность своим учителям: д.м.н., профессору Любови Николаевне Макаровской, д.м.н., профессору Инне Васильевне Рыжко за их многолетнюю бесценную работу, огромный вклад в совершенствование антибактериальной терапии чумы и воспитание целой плеяды учеников и последователей. Ограниченные требованиями к объёму обзора и количеству цитируемой литературы, авторы представили только небольшую часть всех исследований, осуществлённых учёными в данном направлении, и не претендуют на полноту изложения всех достижений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кутырев В.В., Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Меркулова Т.Г. Чума на о. Мадагаскар. Пробл особо опасных инф 2011; 108: 5—9. / Kutyrev V.V., Popov N.V., Eroshenko G.A., Merkulova T.G. Chuma na o. Madagaskar. Probl osobo opasnyh inf 2011; 108: 5—9. [in Russian]
2. Топорков В.А., Величко Л.Н., Шиянова А.Е., Кедрова О.В. Заболеваемость чумой в мире с 1984 по 2006 гг. Мат науч-практ конф госуд-участ СНГ «Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инф. болезнями в госуд.-участ. СНГ» Саратов, 2007; 122—124. / Toporkov V.A., Velichko L.N., Shijanova A.E., Kedrova O.V. Zaboлеваemost' chumoj v mire s 1984 po 2006 gg. Mat nauch-prakt konf gosud-uchast SNG «Mezhdunarodnye mediko-sanitarnye pravila i realizacija global'noj strategii bor'by s inf. boleznyami v gosud.-uchast. SNG» Saratov, 2007; 122—124. [in Russian]
3. Plague in China // http://www.who.int/csr/don/2009_08_11/en/index.html
4. Dawa W., Pan W.J., Gu X.Y., Zhang S.Q., Dawa C., Yi X., Ciwang Z., Wang Y., Li S.Y., Jiang R.M. Clinical features, diagnosis and treatment of 5 cases of primary pneumonic plague in Tibet in 2010. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2011; 34: 6: P. 404—408.
5. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Тихонов Н.Г. и др. Противодействие биотерроризму как новая проблема эпидемиологии. Эпидемиол инф бол 2003; 2: 4—6. / Onishchenko G.G., Fedorov Ju.M., Tihonov N.G. i dr. Protivodejstvie bioterrorizmu kak novaja problema jepidemiologii. Jepidemiol inf bol 2003; 2: 4—6. [in Russian]
6. Inglesby T.V., Dennis D.T., Henderson D.A. et al. Plague as a biological weapon. J. Amer Med Assoc 2000; 283: 17: 2281—2290.
7. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б. и др. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и Эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. Пробл особо опасных инф 2014; 4: 9—16. / Kutyrev V.V., Popova A.Ju., Ezhlava E.B. i dr. Zabolevanie cheloveka chumoj v Gorno-Altajskom vysokogornom prirodnom ochage v 2014 g. Soobshhenie 1. Jepidemiologicheskie i Jepizootologicheskie osobennosti projavlenij chumy v Gorno-Altajskom vysokogornom (Sajljugemskom) prirodnom ochage chumy. Probl osobo opasnyh inf 2014; 4: 9—16. [in Russian]
8. Брюханова Г.Д. Актуальные аспекты эпидемиологии и микробиологии чумы в современных условиях: автореф. дис...д-ра мед. наук. Ставрополь, 2004; 50. / Brjuhanova G.D. Aktual'nye aspekty jepidemiologii i mikrobiologii chumy v sovremennyh uslovijah: avtoref. dis...d-ra med. nauk. Stavropol', 2004; 50. [in Russian]
9. Pollitzer R. Plague. Geneva: 1954; 682.
10. Nguyen V.I., Nguyen D.H., Pham V.D., Nguyen V.L. Peste bubonique et septicemique traitee avec succes par du trimethoprim-sulfamethoxazole. Bull Soc Pathol Exot 1972; 65: 6: 770—786.

11. Boulanger L.L., Ettestad P., Fogarty J.D. et al. Gentamicin and tetracyclines for the treatment of human plague: review of 75 cases in New Mexico, 1985–1999. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 378–385.
12. МУ 3.4.1030-01. Организация, обеспечение и оценка противоэпидемиологической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения особо опасных инфекций, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок, инфекционных болезней неясной этиологии, представляющих опасность для населения Российской Федерации и международного сообщения. Методические указания. М.: 2001; 64. / МУ 3.4.1030-01. Organizacija, obespechenie i ocenka protivoepidemicheskoj gotovnosti medicinskih uchrezhdenij k provedeniju meroprjatij v sluchae zavoza ili vozniknovenija osobo opasnyh infekcij, kontagioznyh virusnyh gemoragicheskix lihoradok, infekcionnyh boleznej nejasnoj jetiologii, predstavljajushhih opasnost' dlja naselenija Rossijskoj Federacii i mezhdunarodnogo soobshhenija: Metodicheskie ukazania. M.: 2001; 64. [in Russian]
13. Lyamuya E.F., Nyanda P., Mohammedali H., Mhalu F. Laboratory studies on *Yersinia pestis* during the 1991 outbreak of plague in Lushoto, Tanzania. *J Trop Med Hyg* 1992; 95: 5: 335–338.
14. Макаровская Л.Н. Антибиотики при экспериментальной чуме. Сообщение I. Изучение лечебного действия различных отечественных антибиотиков при экспериментальной чуме. Сб. науч. работ. Вып. II. Ростов-на-Дону: 1953; 139–142. / *Makarovskaja L.N. Antibiotiki pri jeksperimental'noj chume. Soobshhenie I. Izuchenie lechnogo dejstva razlichnyh otechestvennyh antibiotikov pri jeksperimental'noj chume. Sb. nauch. rabot. Vyp. II. Rostov-na-Donu: 1953; 139–142.* [in Russian]
15. Byrne W.R., Welkos S.L., Pitt M.L. et al. Antibiotic treatment of experimental pneumonic plague in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3: 675–681.
16. Rasoamanana B., Coulanges P., Michel P., Rasolofonirina N. Sensibilite de *Yersinia pestis* aux antibiotiques: 277 souches isolees a Madagascar entre 1926 en 1989. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1989; 56: 37–53.
17. Макаровская Л.Н., Аleshina Е.Н., Тинкер И.С. Динамика образования устойчивых форм чумного микроба к стрептомицину и мистерину. Вторая Всесоюзная конф по антибиотикам: Тез. докл. М.: 1957; 183–184. / *Makarovskaja L.N., Aleshina E.N., Tinker I.S. Dinamika obrazovanija ustojchivyh form chumnogo mikroba k streptomycinu i micerinu. Vtoraja Vsesojuz konf po antibiotikam: Tez. dokl. M.: 1957; 183–184.* [in Russian]
18. Тинкер И.С., Аleshina Е.Н., Макаровская Л.Н. Лечебное действие окситетрациклина, тетрациклина и их сочетаний с некоторыми антибиотиками при экспериментальной чуме обусловленной стрептомициноустойчивыми формами чумного микроба. Вopr. противозидем. защиты. М.: 1962; 2–3: 298–302. / *Tinker I.S., Aleshina E.N., Makarovskaja L.N. Lechebnoe dejstvie oksitetraciklina, tetraciklina i ih sochetanij s некотoryми antibiotikami pri jeksperimental'noj chume obuslovennoj streptomycinoustojchivymi formami chumnogo mikroba. Vopr. protivoepidem. zashhity. M.: 1962; 2–3: 298–302.* [in Russian]
19. Титенко М.Т., Попова Г.О., Шербанюк А.И. и др. Сравнительная эффективность антибиотиков тетрациклинового ряда в профилактике и лечении экспериментальной чумы белых мышей, вызванной подкожным и аэрогенным инфицированием. Вopr. противозидем. защиты. 1976; 25: 206–212. / *Titenko M.T., Popova G.O., Shherbanjuk A.I. i dr. Sravnitel'naja jeffektivnost' antibiotikov tetraciklinovogo rjada v profilaktike i lechenii jeksperimental'noj chumy belyh myshej, vyzvannoj podkozhnym i ajerogennym inficirovaniem. Vopr. protivoepidem. zashhity. 1976; 25: 206–212.* [in Russian]
20. Шербанюк А.И., Макаровская Л.Н., Бугаева О.К., Касаткина И.В. Антибиотики группы аминогликозидов (гентамицин, сизомицин, амикацин) в профилактике и лечении экспериментальной чумной инфекции. Антибиотики и химиотер 1992; 5: 30–31. / *Shherbanjuk A.I., Makarovskaja L.N., Bugaeva O.K., Kasatkina I.V. Antibiotiki gruppy aminoglikozidov (gentamicin, sizomicin, amikacin) v profilaktike i lechenii jeksperimental'noj chumnoj infekcii. Antibiotiki i khimioter 1992; 5: 30–31.* [in Russian]
21. Романов В.Е., Васильев Н.Т., Шабалин Б.А., Миронин А.В. Изучение влияния антибактериальной терапии на эпидемиологическую опасность при экспериментальной легочной форме чумы у обезьян. Антибиотики и химиотер 2001; 4: 16–18. / *Romanov V.E., Vasil'ev N.T., Shabalin B.A., Mironin A.V. Izuchenie vlijanija antibakterial'noj terapii na jepidemiologicheskiju opasnost' pri jeksperimental'noj legochnoj forme chumy u obez'jan. Antibiotiki i khimioter 2001; 4: 16–18.* [in Russian]
22. Романов В.Е., Евстигнеев В.И., Васильев Н.Т. и др. Оценка эффективности антибактериальных препаратов при лечении экспериментальной бубонной формы чумы у обезьян. Антибиотики и химиотер 2001; 8: 6–8. / *Romanov V.E., Evstigneev V.I., Vasil'ev N.T. i dr. Ocenka jeffektivnosti antibakterial'nyh preparatov pri lechenii jeksperimental'noj bubonnoj formy chumy u obez'jan. Antibiotiki i khimioter 2001; 8: 6–8.* [in Russian]
23. Смородинова Ю.В., Шербанюк А.И., Рыжко И.В., Молдаван И.А. Изепамин в профилактике и лечении экспериментальной чумы, вызванной F1⁺ и F1⁻ вариантами возбудителя. Антибиотики и химиотер 2005; 50: 8–9: 23–26. / *Smorodina Ju.V., Shherbanjuk A.I., Ryzhko I.V., Moldavan I.A. Izepamycin v profilaktike i lechenii jeksperi-*
- mental'noj chumy, vyzvannoj F1⁺ i F1⁻ variantami vzbuditelja. Antibiotiki i khimioter 2005; 50: 8–9: 23–26. [in Russian]
24. Butler T. Plague and other *Yersinia* infections. Plenum Med. Book Company. — New York, London: 1983; 177–182.
25. Титенко М.Т., Шербанюк А.И., Лозовой Н.В. и др. Эффективность рифампицина в профилактике и лечении экспериментальной чумы, вызванной подкожным и аэрогенным инфицированием. Вopr. противозидем. защиты 1976; 25: 217–223. / *Titenko M.T., Shherbanjuk A.I., Lozovoj N.V. i dr. Jeffektivnost' rifampicina v profilaktike i lechenii jeksperimental'noj chumy, vyzvannoj podkozhnym i ajerogennym inficirovaniem. Vopr. protivoepidem. zashhity 1976; 25: 217–223.* [in Russian]
26. Рыжко И.В., Шербанюк А.И., Скалыга Е.Ю., Цураева Р.И., Молдаван И.А. Изучение возможности возникновения вирулентных антиген-измененных (Fga⁺; Fga⁻Tox⁺) мутантов чумного микроба, устойчивых к рифампицину и хинолонам. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 4: 19–23. / *Ryzhko I.V., Shherbanjuk A.I., Skalyga E.Ju., Curaeva R.I. Moldavan I.A. Izuchenie vozmozhnosti vozniknovenija virulentnyh antigenizmenennyh (Fga⁺; Fga⁻Tox⁺) mutantov chumnogo mikroba, ustojchivyh k rifampicinu i hinolonam. Antibiotiki i khimioter 2003; 48: 4: 19–23.* [in Russian]
27. Wong J.D., Barash J.R., Sandfort R.F., Janda J.M. Susceptibilities of *Yersinia pestis* strains to 12 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 7: 1995–1996.
28. Рыжко И.В., Шербанюк А.И., Мишанькин Б.Н. и др. Влияние антибиотикостойчивости хромосомного типа у чумного микроба на частоту выявления R-трансконыгантов. Вopr. противозидем. защиты 1978; 28: 34–44. / *Ryzhko I.V., Shherbanjuk A.I., Mishan'kin B.N. i dr. Vlijanie antibiotikoustojchivosti hromosomnogo tipa u chumnogo mikroba na chastotu vyjavlenija R-transkon#jugantov. Vopr. protivoepidem. zashhity 1978; 28: 34–44.* [in Russian]
29. Ермольева З.В., Макаровская Л.Н., Шербанюк А.И. и др. Действие полусинтетических пенициллинов на чумной микроб. Антибиотики 1969; 12: 1077–1081. / *Ermol'eva Z.V., Makarovskaja L.N., Shherbanjuk A.I. i dr. Dejstvie polusinteticheskix penicillinov na chumnoj mikrob. Antibiotiki 1969; 12: 1077–1081.* [in Russian]
30. Марковская Е.И., Макаровская Л.Н., Рыжкова В.В., Зурабян В.А. Лечебное действие азлоциллина и его сочетаний с другими антибиотиками при экспериментальной чуме. Антибиотики и химиотер 1993; 7: 37–39. / *Markovskaja E.I., Makarovskaja L.N., Ryzhkova V.V., Zurbajan V.A. Lechebnoe dejstvie azlocillina i ego sochetanij s drugimi antibiotikami pri jeksperimental'noj chume. Antibiotiki i khimioter 1993; 7: 37–39.* [in Russian]
31. Попова Л.Л., Рыжко И.В., Самоходкина Э.Д., Попельнюк Н.И. Терапевтическая активность азтреонама при экспериментальной чуме. Актуал пробл химиотер бактериал инф: Тез. докл. Всесоюз. конф. М.: 1991; 3: 514–515. / *Popova L.L., Ryzhko I.V., Samohodkina Je.D., Popel'njuk N.I. Terapevticheskaja aktivnost' aztreonama pri jeksperimental'noj chume. Aktual probl himioter bakterial inf: Tez. dokl. Vsesojuz. konf. M.: 1991; 3: 514–515.* [in Russian]
32. Рыжко И.В., Шербанюк А.И., Молдаван И.А., Цураева Р.И., Анисимов Б.И., Тришина А.В. Эффективность цефсиксима и цефепима в сравнении с другими цефалоспоридами при экспериментальной чуме белых мышей, вызванной F1⁺ и F1⁻ вариантами возбудителя. Антибиотики и химиотер 2007; 52: 9–10: 24–27. / *Ryzhko I.V., Shherbanjuk A.I., Moldavan I.A., Curaeva R.I., Anisimov B.I., Trishina A.V. Jeffektivnost' cefiksima i cefepima v sravnenii s drugimi cefalosporinami pri jeksperimental'noj chume belyh myshej, vyzvannoj F1⁺ i F1⁻ variantami vzbuditelja. Antibiotiki i khimioter 2007; 52: 9–10: 24–27.* [in Russian]
33. Тришина А.В., Рыжко И.В., Шербанюк А.И., Цураева Р.И. Карбапенемы в профилактике и лечении экспериментальной чумы белых мышей. Соврем. технол. в реализации глобальной стратегии борьбы с инф. болезнями на территории гос-в-участн. СНГ: Матер. IX Межгос. науч.-практ. конф. государств-участн. СНГ. Волгоград: 2008; 137. / *Trishina A.V., Ryzhko I.V., Shherbanjuk A.I., Curaeva R.I. Karbapenemy v profilaktike i lechenii jeksperimental'noj chumy belyh myshej. Sovrem. tehnol. v realizacii global'noj strategii bor'by s inf. boleznyami na territorii gos-v-uchastn. SNG: Mater. IX Mezghos. nauch.-prakt. konf. gosudarstv-uchastn. SNG. Volgograd: 2008; 137.* [in Russian]
34. Самоходкина Э.Д., Шербанюк А.И., Рыжко И.В. и др. Эффективность офлоксацина при профилактике и лечении экспериментальной чумы, обусловленной природными и антиген-измененными штаммами возбудителя. Антибиотики и химиотер 2002; 3: 26–29. / *Samohodkina Je.D., Shherbanjuk A.I., Ryzhko I.V. i dr. Jeffektivnost' ofloksacina pri profilaktike i lechenii jeksperimental'noj chumy, obuslovennoj prirodnyimi i antigenizmenennymi shtammami vzbuditelja. Antibiotiki i khimioter 2002; 3: 26–29.* [in Russian]
35. Рыжко И.В., Цураева Р.И., Анисимов Б.И., Тришина А.В. Эффективность левофлоксацина, ломефлоксацина и моксифлоксацина в сравнении с другими фторхинолонами при экспериментальной чуме белых мышей, вызванной F1⁺ и F1⁻ штаммами возбудителя. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 5–6: 37–40. / *Ryzhko I.V., Curaeva R.I., Anisimov B.I., Trishina A.V. Jeffektivnost' levofloksacina, lomefloksacina i moksifloksacina v sravnenii s drugimi fluorhinolonami pri jeksperimental'noj chume belyh myshej, vyzvannoj F1⁺ i F1⁻ shtammami vzbuditelja. Antibiotiki i khimioter 2009; 54: 5–6: 37–40.* [in Russian]

36. Layton R.C., Mega W., McDonald J.D., Brasel T.L., Barr E.B., Gigliotti A.P., Koster F. Levofloxacin cures experimental pneumonic plague in African green monkeys. *PLoS Negl Trop Dis*: 2011; 5: 2: 959.
37. Щербанюк А.И., Касаткина И.В., Рыжко И.В. Комбинированное использование хинолонов с другими антибиотиками в лечении экспериментальной чумной инфекции. Антибиотики и химиотер 1994; 5: 38—40. / Shherbanjuk A.I., Kasatkina I.V., Ryzhko I.V. Kombinirovannoe ispol'zovanie hinolonov s drugimi antibiotikami v lechenii jeksperimental'noj chumnoj infekcii. Antibiotiki i khimioter 1994; 5: 38—40. [in Russian]
38. Покровский В.И., Малеев В.В., Щербак Ю.Ф. Особенности клини- ки, диагностики и лечения чумы на современном этапе. Тер архив 1995; 67: 11: 3—5. / Pokrovskij V.I., Maleev V.V., Shherbak Ju.F. Osobennosti kliniki, diagnostiki i lechenija chumy na sovremennom etape. Ter arhiv 1995; 67: 11: 3—5. [in Russian]
39. Lemaître N., Ricard I., Pradel E., Foligné B., Courcol R., Simonet M., Sebbane F. Efficacy of ciprofloxacin-gentamicin combination therapy in murine bubonic plague. *PLoS One* 2012; 7: 12: S2503.
40. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G. et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *New Engl J Med* 1997; 337: 10: 677—680.
41. Dennis D.T., Hughes J.M. Multidrug resistance in plague. *New Engl J Med* 1997; 337: 10: 702—704.
42. Рыжко И.В., Цураева Р.И., Самоходкина Э.Д. и др. Повышение эф- фективности позднего начала этиотропной терапии после примене- ния специфических иммуноглобулинов на ранней стадии развития чумной инфекции у белых мышей. Природно-очаг. инф. в России: совр. эпид. диагност., тактика защиты населения: Тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. Омск: 1998; 163—164. / Ryzhko I.V., Cureau R.I., Samohodkina Je.D. i dr. Povyshenie jeffektivnosti pozdnego nachala jetiotropnoj terapii posle primenenija specificheskikh immunoglobulinov na rannej stadii razvitiya chumnoj infekcii u belyh myshej. Prirodno-ochag. inf. v Rossii: sovr. jepid. diagnost., taktika zashhity naselenija: Tez. dokl. Vseros. nauch.-prakt. konf. Omsk: 1998; 163—164.
43. Молдаван И.А. Экспериментальное обоснование преимуществ со- четанной специфической и экстренной профилактики чумы: Авто- реф. дис. ... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону: 2005; 22. / Moldavan I.A. Jeksperimental'noe obosnovanie preimushhestv sochetannoj speci- fической i jekstrennoj profilaktiki chumy: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Rostov-na-Donu: 2005; 22. [in Russian]
44. Рыжко И.В. Мишанькин М.Б. Тьянова В.И., Цураева Р.И., Молдаван И.А. и др. Инфекционно-токсическая модель чумной инфекции у бе- лых мышей: перспективы использования для оценки эффективности вакцинных и антибактериальных препаратов. Научная мысль Кавказа 2006; 12, Приложение: 321—329. / Ryzhko I.V., Mishan'kin M.B. Tynjanova V.I., Cureau R.I., Moldavan I.A. i dr. Infekcionno-toksicheska- ja model' chumnoj infekcii u belyh myshej: perspektivy ispol'zovaniya dlia ocenki jeffektivnosti vakcinnyh i antibakterial'nyh preparatov. Nauchnaja mys' Kavkaza 2006; 12, Prilozhenie: 321—329. [in Russian]
45. Рыжко И.В. Мишанькин М.Б. Тьянова В.И., Цураева Р.И., Молда- ван И.А. Способ прогнозирования клинической эффективности антибактериальных, вакцинных препаратов, средств пассивной антитоксической иммунотерапии на модели инфекционно-токси- ческой формы чумы у мышей. Патент 2303821 RU, МПК G 09B 23/26, C12Q 1/00, C12R 1/01, G01N33/53, опубл. 27.07.2007; 19: 12. / Ryzhko I.V., Mishan'kin M.B. Tynjanova V.I., Cureau R.I., Moldavan I.A. Sposob prognozirovaniya klinicheskoy jeffektivnosti antibakteri- al'nyh, vakcinnyh preparatov, sredstv passivnoj antitoksicheskoy immunoterapii na modeli infekcionno-toksicheskoy formy chumy u myshej. Patent 2303821 RU, МПК G 09B 23/26, C12Q 1/00, C12R 1/01, G01N33/53, opubl. 27.07.2007; 19: 12. [in Russian]
46. Тришина А.В., Веркина Л.М., Щипелева И.А. Егизарян Л.А. Эффек- тивность нетилимина на модели экспериментальной инфекци- онно-токсической чумы белых мышей. Матер. III Санкт-Петербур- г. междунаrod. эколог. форума: 2014; сентябрь (спец. выпуск.): 115. / Trishina A.V., Verkina L.M., Shhipoleva I.A. Egiazarjan L.A. Jefferktivnost' netilimicina na modeli jeksperimental'noj infekcionno-tok- sической chumy belyh myshej. Mater. III Sankt'-Peterburg. mezhdunar- od. jekolog. foruma: 2014; sentjabr' (spec. vypusk.): 115. [in Russian]
47. Егизарян Л.А., Тришина А.В., Веркина Л.М., Щипелева И.А. Ципроф- локсацин и моксифлоксацин в лечении экспериментальной инфек- ционно-токсической чумы белых мышей, вызванной FI⁺ FI⁻вари- антами возбудителя. Акт.ул. пробл. эпидемиол. и профилактик. мед. Матер. VI Всерос. науч.-практ. конф. молодых учё. и спец-в Роспо- требнадзора. Ставрополь: 2014; 81—82. / Egiazorjan L.A., Trishina A.V., Verkina L.M., Shhipoleva I.A. Ciprofloksacin i moksifloksacin v lechenii jeksperimental'noj infekcionno-toksicheskoy chumy belyh myshej, vyzvannoj FI⁺ FI⁻variantami vzbuditelja. Aktual. probl. jepidemi- ol i profilakt. med. Mater. VI Vseros. nauch.-prakt. konf. molodyh uchjon. i spec-v Rospotrebnadzora. Stavropol': 2014; 81—82. [in Russian]
48. Huang E., Yousef A.E. Paenibacterin, a novel broad-spectrum lipopep- tide antibiotic, neutralises endotoxins and promotes survival in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced sepsis. *International Journal of Antimicrobial Agents* June 2014. Article in press.
49. Walkty A., Adam H., Baxter M. et al. *In vitro* activity of plazomicin against 5,015 gram-negative and gram-positive clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals as part of the canward study, 2011—2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 5: 2554—2563.
50. Mansour H., Chahine E.B., Karaoui L.R., El-Lababidi R.M. Cefetromycin: A new ketolide antibiotic. *Ann Pharmacother* 2013; 47: 3: 368—379.
51. Борздова И.Ю., Малецкая О.В., Логвиненко О.В., Царева Н.С. Разра- ботка схемы лечения экспериментальной чумы липосомальными формами антибиотика и иммуномодулятора. Акт. проблемы бо- лезней, общих для человека и животных: 60 лет ФКУЗ Ставро- польский ПЧИ Роспотребнадзора (23—24 мая 2012 г., Ставро- поль). Ставрополь, 2012; 114—115. / Borzdova I.Ju., Maleckaja O.V., Logvinenko O.V., Careva N.S. Razrabotka shemy lechenija jeksperimen- tal'noj chumy liposomal'nyimi formami antibiotika i immunomoduljato- ra. Akt. problemy boleznej, obshhih dlia cheloveka i zhivotnyh: 60 let FKUZ Stavropol'skij PChI Rospotrebnadzora (23—24 maja 2012 g., Stavropol'). Stavropol', 2012; 114—115. [in Russian]
52. Бондарева Т.А., Поляков А.Ю., Вахнов Е.Ю. Использование полиок- сидония в комплексном лечении генерализованных форм экс- периментальной чумы. Пробл. особо опас. инф. 2009; 1: 99: 67—69. / Bondareva T.A., Poljakov A.Ju., Vahnov E.Ju. Ispol'zovanie polioksi- donija v kompleksnom lechenii generalizovannyh form jeksperimen- tal'noj chumy. Probl. osobo opasn. inf. 2009; 1: 99: 67—69. [in Russian]
53. Viertel T.M., Ritter K., Horz H.-P. Viruses versus bacteria — novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 9: 2326—2336.
54. Lukacik P., Barnard T.J., Keller P.W., Chaturvedi K.S., Seddiki N., Fairman J.W., Noinaj N., Kirby T.L., Henderson J.P., Steven A.C., Hinnebusch B.J., Buchanan S.K. Structural engineering of a phage lysin that targets Gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109, 25: 9857—9862.
55. Lahiri S.D., Johnstone M.R., Ross P.L. et al. Avibactam and class cβ-lac- tamases: mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. *Antimicrob Agents Chemother* October 2014; 58: 10: 5704—5713.
56. Nuding S., Frasch T., Schaller M. et al. Synergistic effects of antimicro- bial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents chemother* October 2014; 58:10: 5719—5725.
57. Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г., Романов В.Е. Перспективы применения антиадгезивной терапии при инфекционных заболева- ниях, обусловленных возбудителями чумы, сибирской язвы и саль- монеллеза. Диагностика, лечение и профилака опас. и особо опасн. инф. забол. Биотехнология.: Матер. Всерос. науч. конф., посвящ. 80- летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ МО». Киров, 2008; 1: 99—103. / Oborin V.A., Pimenov E.V., Ivonin A.G., Romanov V.E. Perspektivy primeneniya antiadgezivnoj terapii pri infekcionnyh zabojevanijah, obuslovlennyh vzbuditeljami chumy, sibirskoj jazvy i sal'monelleza. Diagnostika, lechenie i profilaka opasn. i osobo opasn. inf. zabol. Biotehnologija: Mater. Vseros. nauch. konf., posvjashh. 80-letiju so dnja osnovanija FGU «48 CNII MO». Kirov, 2008; 1: 99—103. [in Russian]
58. Егоров Н.С., Баранова И.П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение. Антибиотики и химиотер 1999; 6: 33—40. / Egorov N.S., Baranova I.P. Bakteriociny. Obrazovanie, svojstva, primenenie. Antibiotiki i khimioter 1999; 6: 33—40. [in Russian]
59. Rosenzweig J.A., Chopra A.K. The effect of low shear force on the viru- lence potential of *Yersinia pestis*: new aspects that space-like growth con- ditions and the final frontier can teach us about a formidable pathogen. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 107.
60. Sharma A., Pan A. Identification of potential drug targets in *Yersinia pestis* using metabolic pathway analysis: as a case study. *Eur J Med Chem* 2012; 57: 185—195.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Щипелева Ирина Александровна — к.б.н., начальник научного отдела — учёный секретарь, ФКУЗ Ростов- ский-на-Дону противочумный институт Роспотреб- надзора, Ростов-на-Дону

Марковская Елена Ивановна — к.м.н., старший науч- ный сотрудник научного отдела, ФКУЗ Ростовский- на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

**УСТОЙЧИВОСТЬ К КОЛИСТИНУ:
К ВОПРОСУ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИБИОТИКА
В СВИНОВОДСТВЕ**

**RESISTANCE TO COLISTIN: WHAT IS THE FATE
FOR THIS ANTIBIOTIC IN PIG PRODUCTION? /
M. RHOUMA, F. BEAUDRY, A. LETELLIER*//
INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL
AGENTS AUGUST 2016; 48: 2: 119–126.**

Колистин, катионный полипептидный антибиотик, получил второе рождение в медицине как «последняя линия обороны» в отношении грамотрицательных бактерий с множественной устойчивостью (MDR-GNB). Колистин широко применяется в ветеринарии при лечении желудочно-кишечных заболеваний, вызванных энтеробактериями. О случаях устойчивости грамотрицательных бактерий к колистину, как следствия хромосомальных мутаций, в медицинской и ветеринарной практике уже было известно, но только в последнее время у колистиноустойчивой *Escherichia coli* был идентифицирован локализованный в плазмиде ген *mcr-1*, кодирующий устойчивость к антибиотику. Открытие внехромосомального механизма устойчивости к колистину вызвало бурную реакцию в научном сообществе, особенно у врачей и ветеринаров. Применение колистина в производстве пищевых продуктов животноводства, особенно в свиноводстве, рассматривалось как главная причина возникновения устойчивости к колистину. В обзоре основное внимание обращено на возможную связь между использованием колистина в свиноводстве и распространением устойчивости к нему среди энтеробактерий. Впервые была показана предполагаемая связь между появлением устойчивости к колистину у энтеробактерий и фармакокинетикой/фармакодинамикой перорального колистина, а также использованием других его лекарственных форм. Дискутируется вопрос о возможном влиянии применения колистина в свиноводстве на положение в здравоохранении с точки зрения устойчивости к антибиотику. Выражена уверенность в необходимости переоценки использования его в свиноводстве, дозирования и оптимизации процесса. Более того, поиск решений, альтернативных использованию колистина, является важнейшим условием сохранения эффективности антибиотика при лечении MDR-GNB инфекций у человека.

* Chaire de recherche en salubrité des viands (CRSV), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC J2S 7C6, Canada.

**ТРАНСФЕРАБЕЛЬНАЯ (ПЕРЕДАЮЩАЯСЯ)
УСТОЙЧИВОСТЬ К КОЛИСТИНУ: НОВАЯ
И В ТО ЖЕ ВРЕМЯ СТАРАЯ УГРОЗА.**

**TRANSFERABLE RESISTANCE TO COLISTIN: A NEW BUT
OLD THREAT / S. SCHWARZ*, A. P. JOHNSON //
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016;
7: 8: 2066–2070.**

В статье суммированы современные сведения о первом и пока единственном трансферабельном гене устойчивости к колистину *mcr-1*. Локализация на конъюгативной плазмиде обеспечивает его распространение среди энтеробактерий у человека и животных. В результате поисковых работ *mcr-1* был идентифицирован на 5 из 7 континентов, а в ретроспективных исследованиях в Китае он был обнаружен у *Escherichia coli*, выделенной в 1980-е гг., тогда как в Европе первые сообщения о нём относятся к 2005 г. Широкое применение колистина в свиноводстве и птицеводстве в некоторых странах и выделение большого числа штаммов-носителей *mcr-1* у животных, чем у людей, склоняет к заключению о происхождении устойчивости в среде животных. Но каково бы ни было происхождение устойчивости, необходим единый глобальный подход в выборе мер для снижения её распространения, включающий надёжное руководство по снижению необоснованного применения антибиотика, оптимизации профилактики инфекции, контролю и наблюдению за применением колистина и уровнем устойчивости к нему в медицине и ветеринарии.

* Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Neustadt-Mariensee, Germany.

**ВЫЯВЛЕНИЕ В АНГЛИИ И УЭЛЬСЕ ПЛАЗМИДНОГО
ГЕНА *MCR-1*, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕГО УСТОЙЧИВОСТЬ
К КОЛИСТИНУ У ШТАММОВ *SALMONELLA ENTERICA*
И *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЧЕЛОВЕКА
И ИЗ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ.**

**DETECTION OF THE PLASMID-MEDIATED *MCR-1*
GENE CONFERRING COLISTIN RESISTANCE IN HUMAN
AND FOOD ISOLATES OF *SALMONELLA ENTERICA*
AND *ESCHERICHIA COLI* IN ENGLAND AND WALES /
M. DOUMITH, G. GODBOLE, P. ASHTON, L. LARKIN,
T. DALLMAN, M. DAY, M. DAY, B. MULLER-PEBODY,
M. J. ELLINGTON, E. DE PINNA, A. P. JOHNSON,
K. L. HOPKINS, N. WOODFORD*// JOURNAL OF
ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016;
7: 8: 2300–2305.**

После первого сообщения о передаваемой с помощью гена *mcr-1* устойчивости к колистину

Escherichia coli и *Klebsiella* spp., выделенных в Китае от животных и человека, была предпринята попытка выявить наличие его у энтеробактерий, выделенных в Великобритании. С помощью Genefinder был проанализирован PHE (Public Health England) архив последовательностей целого генома (WGS) штаммов из коллекций надзорных референс-служб и исследовательских лабораторий на наличие *mcr-1* и его генетического окружения. При быстром скрининге геномов 24000 штаммов *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Campylobacter* spp. и *Shigella* spp., выделенных из пищевых продуктов и от человека, было идентифицировано 15 *mcr-1*-положительных штаммов, включающих 10 штаммов *S. enterica*, выделенных между 2012 г. и 2015 г. (8 *Salmonella* Typhimurium, 1 *Salmonella* Paratyphi B var Java и 1 *Salmonella* Virchow) от 10 больных; 3 штамма *E. coli* — от 2 больных; и 2 штамма *Salmonella* Paratyphi B var Java из мяса птицы, импортированного из Европейского Союза. Ген *mcr-1* был локализован на разных плазмидах, относящихся к типам репликона IncHI2, IncI2 и IncX4, ассоциация их с *ISApI1* варьировала. Шесть *mcr-1*-положительных штаммов *S. enterica* были выделены от больных недавно вернувшихся из путешествия по Азии. Анализ данных WGS подтвердил присутствие *mcr-1* гена плазмидопосредованной устойчивости к колистину при разнообразии генетического окружения и типа плазмиды в штаммах *E. coli* и *Salmonella* spp., выделенных от больных в Англии и Уэльсе, по крайней мере с 2012 г.

* National Infection Service, Public Health England, London NW9 5EQ, UK.

ПОЛНАЯ НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ INC12 ПЛАЗМИДЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ *BLA*_{CTX-M-55} И *MCR-1*.

COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF AN INC12 PLASMID COHARBORING *BLA*_{CTX-M-55} AND *MCR-1* / J. SUN, X.-P. LI, R.-S. YANG, L.-X. FANG, W. HUO, S.-M. LI, P. JIANG, X.-P. LIAO, Y.-H. LIU* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2016; 60: 8: 5014—5017.

Сообщается о полной нуклеотидной последовательности плазмиды, несущей *bla*_{CTX-M-55} и *mcr-1*, из штамма *Escherichia coli*, выделенной от цыплёнка. Плазмида pA31-12 содержала IncI2 репликон и проявляла сильное сходство последовательностей с несущей *bla*_{CTX-M-55} плазмидой pHN1122-1 и *mcr-1* несущей плазмидой pHNSHP45. Инсерционные последовательности *ISEcp1* и *ISApI1* были ответственны за мобилизацию *bla*_{CTX-M-55} и *mcr-1*, соответ-

ственно. Совместная локализация *mcr-1* с геном бета-лактамазы расширенного спектра действия на конъюгативной плазмиде может ускорять диссеминацию обоих генов с помощью коселекции.

* National Risk Assessment Laboratory for Antimicrobial Resistance of Animal Original Bacteria, South China Agricultural University, Guangzhou, People's Republic of China

* Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou, People's Republic of China

* Jiangsu Co-innovation Centre for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu, People's Republic of China.

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К КОЛИСТИНУ *MCR-1* У УСТОЙЧИВЫХ К КАРБАПЕНЕМАМ ENTEROBACTERIACEAE В РАЗНЫХ БОЛЬНИЦАХ КИТАЯ.

DETECTION OF THE *MCR-1* COLISTIN RESISTANCE GENE IN CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE FROM DIFFERENT HOSPITALS IN CHINA / H. YU, F. QU, B. SHAN, B. HUANG, W. JIA, C. CHEN, A. LI, M. MIAO, X. ZHANG, C. BAO, Y. XU, K. D. CHAVDA, Y.-W. TANG, B. N. KREISWIRTH, H. DU*, L. CHEN // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2016; 60: 8: 5033—5035.

Распространение *mcr-1* гена плазмидопосредованной устойчивости к колистину среди клинических штаммов карбапенемоустойчивых энтеробактерий (CRE) представляет серьёзную угрозу глобальному здравоохранению. Сообщается об идентификации 3-х карбапенемоустойчивых штаммов *Escherichia coli*, содержащих *mcr-1*, выделенных от 3-х больных в 2-х провинциях Китая. Полученные результаты показывают, что *mcr-1*-содержащие штаммы дают начало распространению их в разных больницах Китая. В сообщении впервые дано описание хромосомальной интеграции *mcr-1* в карбапенемоустойчивый штамм *E. coli*.

* Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, China.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДОПОСРЕДОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ПОЛИМИКСИНУ (*MCR-1*) МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯХ И ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИСПРАЖНЕНИЙ.

**REAL-TIME PCR FOR DETECTION
OF PLASMID-MEDIATED POLYMYXIN RESISTANCE
(MCR-1) FROM CULTURED BACTERIA AND STOOLS /
S. BONTRON, L. POIREL*, P. NORDMANN //
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016;
71: 8: 2318–2320.**

Разработан простой метод быстрого выявления гена *mcr-1*, недавно идентифицированного в качестве детерминанты плазмидо-опосредованной трансмиссивной устойчивости к полимиксинам у энтеробактерий. В основу был положен SYBR Green - метод ПЦР в реальном времени, который был проверен на культивируемых бактериях, потенциальных носителях гена, и выделенных из испражнений человека и крупного рогатого скота. Как показали результаты, нижняя граница обнаружения гена *mcr-1* составляет 10^2 для культивируемых бактерий. Тестирование очень чувствительное, специфическое и не даёт ложно-положительных результатов. Метод также исключительно надёжен при применении к испражнениям, предположительно содержащим *mcr-1*- положительную *Escherichia coli*. Предлагаемый простой, быстрый, чувствительный и специфический метод может быть полезен при быстром скрининге уровня устойчивости в медицине и ветеринарии.

* Emerging Antibiotic Resistance Unit, Medical and Molecular Microbiology, Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland.

МЕХАНИЗМЫ ПРИОБРЕТЕНИЯ *BLA*_{NDM} ГЕНОВ ПЛАЗМИДАМИ *INCA/C*₂ И *INCFII*_γ.

**MECHANISMS INVOLVED IN ACQUISITION
OF *BLA*_{NDM} GENES BY *INCA/C*₂ AND *INCFII*_γ PLASMIDS /
A. M. WAILAN*, H. E. SIDJABAT,
W. K. YAM, N.-F. ALIKHAN, N. K. PETTY, A. L. SARTOR,
D. A. WILLIAMSON, B. M. FORDE, M.A. SCHEMBRI,
S. A. BEATSON, D. L. PATERSON, T. R. WALSH,
S. R. PARTRIDGE // ANTIMICROBIAL AGENTS
CHEMOTHERAPY JULY 2016; 60: 7: 4082–4088.**

Гены *bla*_{NDM}, обеспечивающие устойчивость к карбапенемам, обнаружены на трансферабельных плазидах, относящихся к различным несовместимым (*Inc*) группам. Представлены полные последовательности 4-х несущих *bla*_{NDM} ген плазмид, *pKP1*-NDM-1, *pEC2*-NDM-3, *pECL3*-NDM-1 и *pEC4*-NDM-6, обнаруженных в 4-х клинических штаммах, выделенных от 4-х разных больных. Различные плазмиды из *Acinetobacter* содержали сегменты, пристроенные к разным частям области *bla*_{NDM}. Плазмиды *pKP1*-NDM-1 и *pEC2*-NDM-3 из *Klebsiella pneumoniae* и

Escherichia coli, соответственно, идентифицированы как плазмиды *IncA/C*₂ 1 типа с почти идентичной основной (скелетной) структурой. Различные области, несущие *bla*_{NDM}, встроены в разные локусы «островка устойчивости к антибиотикам», известного как *ARI-A*, и *ISCR1* может принимать участие в приобретении *bla*_{NDM} с помощью *pEC2*-NDM-3. Плазмиды *pECL3*-NDM-1 и *pEC4*-NDM-6 от *Enterobacter cloacae* и *E.coli*, соответственно, имеют сходную основную структуру *IncFII*_γ, но различную локализацию областей, несущих *bla*_{NDM}. В приобретении *pEC4*-NDM-6 гена *bla*_{NDM} и *rmtC*, гена метилазы 16S rRNA плазмидами *IncFII*_γ, по-видимому, принимают участие подвижные элементы *Tn3*-производных с инвертируемыми повторами. Дополнительная характеристика этих плазмид показывает, что даже близко родственные плазмиды могут приобретать гены *bla*_{NDM} с помощью различных механизмов. Приведённые данные иллюстрируют сложность взаимоотношений между генами антибиотикоустойчивости, подвижными элементами и плазмидами и способствуют пониманию возможных путей перемещения *bla*_{NDM} среди видов семейства *Enterobacteriaceae*.

* The University of Queensland, UQ Centre for Clinical Research, Herston, Queensland, Australia.

**ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ПЛАЗМИД,
КОДИРУЮЩИХ КАРБАПЕНЕМАЗЫ, И СРАВНЕНИЕ
С ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИМИ ДАННЫМИ БОЛЬНИЦ.**

**HORIZONTAL TRANSFER OF CARBAPENEMASE-
ENCODING PLASMIDS AND COMPARISON WITH
HOSPITAL EPIDEMIOLOGY DATA / C. A. HARDIMAN,
R. A. WEINGARTEN, S. CONLAN, P. KHIL, J. P. DEKKER,
A. J. MATHERS, A. E. SHEPPARD, J. A. SEGRE,
K. M. FRANK* // ANTIMICROBIAL AGENTS
CHEMOTHERAPY AUGUST 2016; 60: 8: 4910–4919.**

Микроорганизмы, продуцирующие карбапенемазы, широко распространены во всём мире, и показатель заболеваемости вызванными ими инфекциями значителен. В распространении грамотрицательных бактерий с множественной устойчивостью важную роль играет горизонтальный перенос плазмид, несущих гены, кодирующие карбапенемазы. Исследовали условия, регулирующие конъюгацию, используя в качестве реципиента лабораторный штамм *Escherichia coli*, лишённый плазмид, или системы рестрикционной модификации фермента, а в качестве донора — штаммы, выделенные от больных. Поскольку конъюгация строго регулируется, был выполнен систематический анализ переноса *bla*_{KPC}-кодирующих плазмид *Klebsiella pneumoniae* в множество штаммов при различных внешних усло-

виях для определения наиболее важных переменных величин. Были использованы 4 *bla*_{KPC}-несущие плазмиды, полученные из 2-х больниц: pKpQIL и pKPC-47e (National Institutes of Health) и pKPC_UVA01 и pKPC_UVA02 (University of Virginia). Показатели частоты переноса плазмиды существенно различались в зависимости от пары донор-реципиент, кроме этого, на частоту переноса также влияли состав плазмиды, температура, субстрат. Конъюгация pKPC-47e была ослаблена во всех испытанных условиях. Несмотря на присутствие во многих клинических видах микроорганизмов, pKPC_UVA01 имела более низкий показатель частоты конъюгации в реципиентные штаммы, чем pKpQIL. Частота конъюгации этих плазмид в штаммах *K.pneumoniae* и *E.coli*, выделенных от больных, не имела чёткой корреляции с клиническими эпидемиологическими данными. Полученные результаты высветили важность каждой из испытанных переменных величин. На *in vitro* моделях нельзя сделать надёжный прогноз переноса плазмид, имеющего место быть в популяции больных, поэтому необходимы дальнейшие исследования для определения наиболее важных переменных величин, влияющих на горизонтальный перенос *in vivo*.

* National Institutes of Health Clinical Center, Bethesda, Maryland, USA.

ДИССЕМИНАЦИЯ *BLAKPC* ГЕНА КЛОНАЛЬНЫМ РАСПРОСТРАНЕНИЕМ И ГОРИЗОНТАЛЬНЫМ ПЕРЕНОСОМ: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЁННОСТИ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ.

DISSEMINATION OF THE *BLAKPC* GENE BY CLONAL SPREAD AND HORIZONTAL GENE TRANSFER: COMPARATIVE STUDY OF INCIDENCE AND MOLECULAR MECHANISMS / A. ADLER*, E. KHABRA, S. PAIKIN, Y. CARMELI // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 8: 2143–2146.

Наряду с глобальным распространением клонального комплекса (CC)-258 клона KPC-продуцирующей *Klebsiella pneumoniae* (KPC-KP) *bla*_{KPC} ген может также распространяться за счёт горизонтального переноса. Основанием для такого предположения является выделение от одного больного нескольких KPC-продуцирующих видов Enterobacteriaceae (KPC-Ent). Были охарактеризованы распространённость и молекулярные механизмы переноса у KPC-KP штаммов, единственных выделенных в пробе (singular, sKPC-KP), так и при одновременном присутствии других KPC-Ent видов (joint, jKPC-KP). Все штаммы были собраны с апреля 2011 г. по август 2012 г. в Медицинском

центре Laniado. Типирование их было выполнено методами множественной (multiplex) ПЦР CC-258 и MLST. Генетическое окружение *bla*_{KPC} гена было изучено методом секвенирования. В течение 17 месяцев было зафиксировано 281 случай sKPC-KP и 8 случаев jKPC-KP ($p < 0,0001$). У больных с jKPC-KP дополнительными видами KPC-Ent были *Escherichia coli* ($n=6$), *Enterobacter aerogenes* ($n=1$), *Enterobacter cloacae* ($n=1$) и *Citrobacter freundii* ($n=1$). Все протестированные sKPC-KP ($n=27$) принадлежали CC-258 клону и содержали *bla*_{KPC-3} аллель, локализованную в Tn4401a транспозоне, в отличие от jKPC-KP/ KPC-Ent, относящихся к различным сиквенс — типам (ST) и несущих *bla*_{KPC-2} аллель, а ген *bla*_{KPC-2} был локализован в Δ Tn4401c, находящемся на плаزمиде IncN/pMLST ST-15 типа, обладающих высокой конъюгативной эффективностью. Настоящее исследование выявило два механизма диссеминации *bla*_{KPC} гена: клональное распространение CC-258 клона и менее общего механизма горизонтального переноса, опосредованного ST-15 плазмидами, которые челночным образом переносятся между различными видами и клонами.

* Tel-Aviv Sourasky Medical Center, 6 Weizmann Street, Tel-Aviv 6423906, Israel.

ВЛИЯНИЕ *BLANDM-1* НА ФИТНЕСС И ПАТОГЕННОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*.

IMPACT OF *BLANDM-1* ON FITNESS AND PATHOGENICITY OF *ESCHERICHIA COLI* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* / S. GÖTTIG, S. RIEDEL-CHRIST, A. SALEH, V. A. J. KEMPF, A. HAMPRECHT* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 216 47: 6: 430–435.

Предметом исследования было определение влияния приобретения гена нью-делийской металло-бета-лактамазы-1 (NDM-1) на фитнесс и вирулентность *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Кинетику роста и оценку фитнесса при носительстве NDM-1 плазмиды оценивали на изогенных штаммах *E.coli* J53 и *K.pneumoniae* PRZ *in vitro* методами парной конкуренции. Патогенность экспрессирующих NDM-1 штаммов *E.coli* и *K.pneumoniae* и изогенный контроль были проанализированы на *in vivo* модели инфекции *Galleria mellonella*. Цитотоксичность NDM-1 экспрессирующих штаммов оценивали на A549 эпителиальных лёгочных клетках человека методом с лактатдегидрогеназой (ЛДГ). Различий в кинетике роста между NDM-1-экспрессирующим и контрольным штаммами не было установлено ($p=0,92$). Снижение фитнесса наблюдали у NDM-1-штаммов *E.coli* J53 и *K.pneumoniae* PRZ [константа скорости селекции (s)= $-1,27 \pm 0,27$ у *E.coli* J53 и $-0,19 \pm 0,14$ у *K.pneumoniae* PRZ].

ae PRZ; $p < 0,0001$]. Выживаемость личинок *G.melonella*, инфицированных NDM-1 и контрольными штаммами *E.coli* J53 и *K.pneumoniae* PRZ, была сходной. Экспрессия NDM-1 не влияла на цитотоксичность в отношении A549 клеток ($p > 0,05$). Наличие *bla*_{NDM-1} не повышало вирулентность и цитотоксичность изогенных штаммов. Однако, носительство pNDM-1 плазмиды значительно снижало фитнес, причём в большей степени у *E.coli* J53 по сравнению с *K.pneumoniae* PRZ.

* Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University Hospital of Cologne, Goldenfelsstrasse 19-21, 50935 Cologne, Germany.

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ И РАЗНООБРАЗИЕ INCX ПЛАЗМИД, НЕСУЩИХ ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ И БЕТАЛАКТАМАМ, У ESCHERICHIA COLI, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ В РАЗЛИЧНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ЗОНАХ.

PREVALENCE AND DIVERSITY OF INCX PLASMIDS CARRYING FLUOROQUINOLONE AND β -LACTAM RESISTANCE GENES IN ESCHERICHIA COLI ORIGINATING FROM DIVERSE SOURCES AND GEOGRAPHICAL AREAS / H. DOBIASOVA*, M. DOLEJSKA // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2016; 71: 8: 2118—2124.

Целью работы было описание распространённости и разнообразия IncX плазмид, содержащих гены антибиотикоустойчивости, у представителей Enterobacteriaceae и определение происхождения семейства плазмид. IncX плазмиды выявлены у 1894 штаммов Enterobacteriaceae, устойчивых к цефотаксиму (2 мг/л) или со сниженной чувствительностью к ципрофлоксацину (0,05 мг/л), выделенных из различных источников на 5 континентах с использованием ПЦР. Штаммы, содержащие IncX плазмиды, были идентифицированы методом MALDI-TOF или биохимическими тестами, гены антибиотикоустойчивости — ПЦР и секвенированием, клональная принадлежность — PFGE. Горизонтальный перенос плазмид определяли трансформацией и конъюгацией. IncX плазмиды были охарактеризованы с помощью S-1 нуклеазы, PFGE, RFLP (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) и гибридизацией. В целом 164 штамма *Escherichia coli* (8,7%, $n=1894$) содержали по крайней мере одну подгруппу IncX. Семь штаммов содержали две разные подгруппы. IncX1 подгруппа была обнаружена у 93 штаммов, IncX2 — 35, IncX4 — 28 и IncX3 — 15 штаммов. Плазмиды IncX4 не подвергались индивидуальному горизонтальному переносу и были исключены из дальнейшего исследо-

вания. Самыми распространёнными были IncX1 плазмиды, содержащие *qnrS1* и *bla*_{TEM-1}, -135 гены и обнаруженные у 36 штаммов *E.coli* из разных источников Европы и Австралии, и IncX2, несущие гены *qnrS1* и *tet(A)*, у 9 штаммов, выделенных от диких животных в Европе. IncX3 плазмиды содержали преимущественно *bla*_{SHV-12} и *qnrS1* или *qnrB7*. IncX плазмиды широко распространены среди диких животных в Европе и, главным образом, ассоциируются с генами устойчивости к фторхинолонам. Плазмиды с неопределённым рестрикционным профилем были выявлены у *E.coli* из разных источников и стран, что предполагает широкую диссеминацию источников происхождения некоторых плазмид.

* Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic.

ТРАНСКРИПТОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ У PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

TRANSCRIPTOME PROFILING OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN PSEUDOMONAS AERUGINOSA / A. KHALEDI, M. SCHNIEDERJANS, S. POHL, R. RAINER, U. BODENHOFER, B. XIA, F. KLAWONN, S. BRUCHMANN, M. PREUSSE, D. ECKWEILER, A. DÖTSCH, S. HÄUSSLER* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2016; 60: 8: 4722—4733.

Развивающаяся устойчивость к антимикробным препаратам и недостаток новых антибиотиков подтверждают необходимость оптимизации современной диагностики и лечения в целях снижения развития и распространения множественной устойчивости. Поскольку статус антибиотикоустойчивости патогенной бактерии определяется её геномом, определением характера (профиля) устойчивости и последующим использованием технологий секвенирования (next-generation sequencing, NGS) можно в будущем выполнять идентификацию патогена, чтобы быстро начать индивидуализированное лечение и выполнять оптимизированный контроль за инфекцией. Описан метод качественного секвенирования РНК для идентификации ключевых генетических детерминант антибиотикоустойчивости у 135 клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в различных географических регионах из разных мест локализации инфекции. С использованием транскриптомных ассоциативных исследований были установлены адаптивные изменения, связанные с устойчивостью к таким классам антибио-

тиков, как фторхинолоны, аминогликозиды и бета-лактамы. Кроме потенциальных новых биомаркеров, напрямую коррелирующих с устойчивостью, с помощью автоматизированных прогностических подходов были определены общие (global) изменения генной экспрессии, ассоциированные с фенотипом, и вариации последовательности. Настоящее исследование имеет целью разработать, основываясь на генотипе, молекулярный диагностический аппарат для определения профиля устойчивости патогенной бактерии в реальном времени и наметить направление развития ускоренной диагностики для стратегий более эффективного прицельного лечения, чтобы ослабить возможности эволюции устойчивости в будущем.

* Department of Molecular Bacteriology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany.

* Institute for Molecular Bacteriology, TWINCORE GmbH, Centre for Clinical and Experimental Infection Research, Hanover, Germany.

РАЗРУШЕНИЕ ГЛЮТАТИОНОМ БИОПЛЁНОК КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРИВОДИТ К УСИЛЕНИЮ АНТИБИОТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА И НОВОЙ ТРАНСКРИПТОМЕ БИОПЛЁНКИ.

GLUTATHIONE-DISRUPTED BIOFILMS OF CLINICAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS EXHIBIT AN ENHANCED ANTIBIOTIC EFFECT AND A NOVEL BIOFILM TRANSCRIPTOME / W. KLARE*, T. DAS, A. IBUGO, E. BUCKLE, M. MANEFIELD, J. MANOS // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2016; 60: 8: 4539—4551.

Pseudomonas aeruginosa инфекции у больных муковисцидозом (МВ) характеризуются высоким показателем заболеваемости и смертности, часто преждевременной. Эти инфекции осложнены образованием биоплёнок в мокроте. Антибиотикотерапия затруднена из-за устойчивости матрицы биоплёнки к антибиотикам, поэтому очень желательна новая противоплёночная стратегия. Внутри плёнок окислительно-восстановительный потенциал пиоцианина, при взаимодействии его с внеклеточной ДНК, усиливает целостность биоплёнки. Антиоксидант глутатион (GSH), реагируя с пиоцианином, нарушает это взаимодействие. Исследовали разрушающее биоплёнку действие глутатиона, определяя физиологическое влияние GSH и ДНКазы I на биоплёнки клинических МВ штаммов, выросших в искусственной МВ среде (ASMDM+). Конфокальное сканирование в лазерном микроскопе показало, что 2 mM GSH, одного или в комбинации с

ДНКазой I, значительно разрушают незрелую (24 ч) биоплёнку, образованную изогенами AES-1R и AES-1M австралийского эпидемического штамма (AES). Взятый в отдельности GSH сильно разрушал зрелые (72 ч) биоплёнки AES-R1 в результате разностной экспрессии 587 генов, как показал анализ секвенирования РНК (RNA-seq). Активированными оказались системы биосинтеза циклического дигуанилата и пиовердина, выделительной системы IV типа, нитратный метаболизм и механизм трансляции. Разрушение биоплёнки GSH выявило различия в клеточной физиологии зрелых и диспергированных биоплёнок. Результаты RNA-seq были подтверждены биохимическими определениями и с помощью количественной ПЦР. Ряд биоплёнок МВ штаммов, разрушенных GSH и ДНКазой I, был значительно более чувствительным к ципрофлоксацину, эффективность антибиотика возрастала с увеличением концентрации GSH. Исследование показало, что GSH, один или в комбинации с ДНКазой I, в сочетании с соответствующим антибиотиком представляет эффективное антиплёночное средство, что в дальнейшем будет проверено в *in vivo* исследованиях.

* Department of Infectious Disease and Immunology, Charles Perkins Centre, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia.

ОБНАРУЖЕНИЕ И АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОДАВЛЯЮЩИХ СИНТЕЗ БЕЛКА У *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

DISCOVERY AND ANALYSIS OF NATURAL-PRODUCT COMPOUNDS INHIBITING PROTEIN SYNTHESIS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* / Y. HU, M. KENIRY, S. O. PALMER, J. M. BULLARD* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2016; 60: 8: 4820—4829.

Синтез белка у бактерий является мишенью многочисленных природных и синтетических антибактериальных соединений. Разработана поли(У) мРНК-управляемая система белкового синтеза через аминокислотилирование/трансляцию (А/Т), включающая фенилаланил-тРНК синтетазы (PheRS), рибосомы и рибосомальные факторы из *Pseudomonas aeruginosa*. Система была использована для скрининга природных соединений. Для каждого компонента системы были разработаны методы определения специфических мишеней соединений с ингибиторными свойствами. В результате поиска были идентифицированы 13 соединений, подавляющих синтез белка и имеющих значения 50% подавляющей концентрации в пределах 0,3–80 мкМ. МПК роста были определены в отношении таких патогенов, как

Enterococcus faecalis, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *P.aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. Три соединения характеризовались широким спектром действия и подавляли сверхчувствительный штамм *P.aeruginosa* (МПК) при 8–16 мкг/мл. Молекулярной мишенью всех 3-х соединений была PheRS. Одно соединение обладало бактериостатическим действием, второе — бактерицидным в отношении грам+ и грам- бактерий, третье — бактериостатическим в отношении грам+ и бактерицидным в отношении грам- бактерий. Все три соединения были конкурентами субстрата АТФ; однако с аминокислотным субстратом одно соединение было конкурентным, второе — неконкурентным, третье — noncompetitive. Методами макромолекулярного синтеза было подтверждено подавление синтеза белка указанными соединениями. Согласно данным МТТ теста цитотоксичности, эти соединения были в 25000 раз менее активны, чем стауроспорин (контроль), при тестировании в отношении культивируемых клеток человека.

* Chemistry Department, The University of Texas-RGV, Edinburg, Texas, USA.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО АНТИБИОТИКА POL7001 НА ДОКЛИНИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ ПНЕВМОНИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

EFFICACY OF THE NOVEL ANTIBIOTIC POL7001 IN PRECLINICAL MODELS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PNEUMONIA /C. CIGANA, F. BERNARDINI, M. FACCHINI, B. ALCALÁ-FRANCO, C. RIVA, I. DE FINO, A. ROSSI, S. RANUCCI, P. MISSON, E. CHEVALIER, M. BRODMANN, M. SCHMITT, A. WACH, G. E. DALE, D. OBRECHT*, A. BRAGONZI // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2016; 60: 8: 4991–5000.

В случае не поддающихся лечению форм лёгочных инфекций, обусловленных *Pseudomonas aeruginosa*, первоочередной задачей является исследование в клинике антибиотиков с новыми механизмами действия в сочетании с эффективной доставкой лекарства в лёгкие. Макроциклический антибиотик POL7001 с избирательной высокой активностью в отношении *P.aeruginosa* относится к новому классу миметиков эпитопа белка. Для установления клинической эффективности нового антибиотика при лечении *P.aeruginosa* лёгочных инфекций в качестве индикаторных инфекций были выбраны вентиляторно-ассоциированная пневмония (ВАП) и муковисцидоз (МВ). Были определены значения МПК POL7001 и антибиотиков сравнения в отношении референс- и клинических штам-

мов *P.aeruginosa*. Терапевтическую эффективность оценивали при введении антибиотика в лёгкие мышам с острой и хронической *P.aeruginosa* пневмонией. POL7001 продемонстрировал высокую *in vitro* активность в отношении большого набора штаммов *P.aeruginosa*, выделенных от больных МВ, включая штаммы с мультилекарственной устойчивостью и адаптированными фенотипами, как-то мукоидным и гипермутабельным. Эффективность POL7001 была показана как на обычных, так и на МВ мышах. Кроме снижения бактериальной нагрузки в лёгких, у мышей, леченных POL7001, наблюдали прогрессирующее увеличение массы тела, снижение маркёров воспаления, что свидетельствовало об общем улучшении их состояния. Как показали фармакокинетические исследования, после лёгочного введения POL7001 его концентрации в лёгких достигали значительных значений, при низкой системной экспозиции. Предполагаются дальнейшие исследования. POL7001 в качестве нового терапевтического средства при лечении лёгочных инфекций, вызываемых *P.aeruginosa*.

* Polyphor Ltd., Allschwil, Switzerland.

ИНДИВИДУАЛЬНОЕ И КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕРОПЕНЕМА, ИМИПЕНЕМА, СУЛБАКТАМА, КОЛИСТИНА И ТИГЕЦИКЛИНА НА КЛЕТКИ *ACINETOBACTER BAUMANNII* В БИОПЛЁНКЕ И СТРУКТУРУ БИОПЛЁНКИ.

INDIVIDUAL OR COMBINED EFFECTS OF MEROPENEM, IMIPENEM, SULBACTAM, COLISTIN, AND TIGECYCLINE ON BIOFILM-EMBEDDED *ACINETOBACTER BAUMANNII* AND BIOFILM ARCHITECTURE / Y.-C. WANG, S.-C. KUO, Y.-S. YANG, Y.-T. LEE, C.-H. CHIU, M.-F. CHUANG, J.-C. LIN, F.-Y. CHANG, T.-L. CHEN* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY AUGUST 2016; 60: 8: 4670–4676.

Биоплёнки *Acinetobacter baumannii* трудно поддаются удалению. Исследовали действие меропенема (2 мг/л), имипенема (2 мг/л), сулбактама (4 мг/л), колистина (2 мг/л) и тигециклина (2 мг/л), взятых по отдельности и в комбинации, на включённые в биоплёнку клетки *A.baumannii* устойчивого и чувствительного к карбапенемам (CRAb и CSAb, соответственно) штаммов, а также на строение биоплёнки. Были использованы *A.baumannii* ATCC 15151 (Ab15151) и его трансформант, суперпродуцент OXA-82, 2 клинических CSAb и 2 клинических CRAb штамма разной клоальности. Значения МПК для заключённых в биоплёнку клеток всех 6 испытанных штаммов были более чем в 50 раз выше значений МПК для планктонных клеток. По числу оставшихся жизнеспособ-

ных клеток CSAb в плёнке меропенем проявил наивысшую бактерицидную активность по сравнению с остальными антибиотиками. В отношении 2-х клинических CRAb штаммов комбинации меропенем+сульбактам и сульбактам+тигециклин после 48 ч обработки показали активность, более чем в 100 раз превышающую активность антибиотиков, взятых в отдельности. Действие антибиотиков на структуру биоплёнки исследовали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе после окрашивания зелёным флуоресцирующим с использованием программы COMSTAT. После экспозиции с меропенемом и имипенемом наблюдали значительное снижение толщины биоплёнки. Комбинация меропенем+сульбактам существенно снижала биомассу и

толщину биоплёнки, увеличивала коэффициент её шероховатости, сочетание сульбактам+тигециклин уменьшало максимальную и среднюю толщину биоплёнки в отличие от отдельно взятых антибиотиков. Меропенем был активен в отношении клеток CSAb, включённых в биоплёнки, тогда как комбинация меропенем+сульбактам проявляла синергидный эффект в отношении клеток CRAb и значительно нарушала структуру биоплёнки, чем при обработке отдельными антибиотиками.

* Institute of Clinical Medicine, School of Medicine, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan.

Подготовлено Н. С. Бондаревой (Москва)

Возможность терапии полимикробных и резистентных инфекций

Грамположительные
Грамотрицательные
Атипичные
Анаэробы
Резистентные грамположительные
Резистентные грамотрицательные

Спектр активности Тигацила:¹⁻³

- БЛРС-продуценты*
- MRSA**
- VRE***
- *Acinetobacter baumannii*
- *Stenotrophomonas maltophilia*

Краткая информация по применению препарата ТИГАЦИЛ®

МНН: тигециклин

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА: лиофилизат для приготовления раствора для инфузий

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Антибиотик тигециклин принадлежит к классу глицилциклинов, структурно сходному с тетрациклинами. Ингибирует трансляцию белка у бактерий за счёт связывания с 30S-субъединицей рибосомы и блокирования проникновения молекул аминоацил-tРНК на А-сайт рибосомы, что препятствует включению аминокислотных остатков в растущие пептидные цепи. Считается, что тигециклин обладает бактериостатическими свойствами. Тигециклин может преодолевать два основных механизма резистентности микроорганизмов, наблюдаемых в отношении тетрациклинов: рибосомальную защиту и активное выведение. Тигециклин подвергается воздействию хромосомальных эффлюксных насосов *Proteaceae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Микроорганизмы, принадлежащие к группе *Proteaceae* менее чувствительны к тигециклину, чем другие представители *Enterobacteriaceae*. Описана пониженная чувствительность к тигециклину и *Acinetobacter baumannii*. Между тигециклином и большинством классов антибиотиков не существует перекрёстной устойчивости. Менее 20% тигециклина подвергается метаболизму. Тигециклин не подавляет метаболизм, опосредованный следующими шестью изоферментами цитохрома P450 (CYP). Отмечено, что 59% назначенной дозы выводится через кишечник (при этом большая часть неизменённого тигециклина поступает в жёлчь), а 33% выводится почками.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Взрослые

- Осложнённые инфекции кожи и мягких тканей.
- Осложнённые интраабдоминальные инфекции.
- Внебольничная пневмония.

Не применяется для лечения синдрома диабетической стопы, госпитальной пневмонии или пневмонии, связанной с искусственной вентиляцией лёгких.

Дети старше 8 лет

- Осложнённые инфекции кожи и мягких тканей. Не применяется при синдроме диабетической стопы.
- Тигециклин показан к применению в случаях, когда альтернативные антибиотики не подходят.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Повышенная чувствительность к любому из компонентов препарата или к антибиотикам класса тетрациклинов. Эффективность и безопасность у детей до 8 лет не установлена.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ

Внутривенно, капельно в течение 30-60 минут.

Взрослые

Начальная доза для взрослых составляет 100 мг, далее по 50 мг через каждые 12 часов. Продолжительность лечения определяется тяжестью и локализацией инфекции и клинической реакцией больного на лечение. Коррекция дозы не требуется больным с почечной недостаточностью, пожилым пациентам, а также больным с лёгкими и среднетяжёлыми нарушениями функции печени. Больным с тяжёлой печёночной недостаточностью (класс С по классификации Чайлд-Пью) после введения начальной дозы Тигацила 100 мг в последующем препарат назначают по 25 мг каждые 12 часов, при этом необходимо соблюдать осторожность и контролировать реакцию больных на лечение.

Дети

Дети в возрасте 8-11 лет: 1,2 мг/кг каждые 12 часов. Максимальная доза 50 мг тигециклина каждые 12 часов.

Дети в возрасте 12-17 лет: 50 мг тигециклина каждые 12 часов.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ

Имеются сообщения о развитии острого панкреатита на фоне приёма Тигацила, в некоторых случаях с летальным исходом. Необходимо проявлять осторожность при применении Тигацила

у пациентов с подозрением на острый панкреатит (клинические симптомы или соответствующие изменения лабораторных показателей). В клинических исследованиях было отмечено увеличение общей смертности по сравнению с препаратами сравнения. Поэтому Тигацил® должен применяться только в случаях отсутствия альтернативной терапии. Данные о применении препарата Тигацил® у детей ограничены. Поэтому применение препарата рекомендовано в тех ситуациях, когда альтернативная антибактериальная терапия недоступна. Тошнота и рвота являются самыми распространёнными побочными реакциями у детей и подростков. Следует особое внимание уделять риску дегидратации.

ПОБОЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Наиболее часто тошнота, рвота, которые обычно возникали в начале лечения (в первый или второй день лечения) и в большинстве случаев были лёгкими или среднетяжёлыми. Часто: увеличение АЧТВ, протромбинового времени, анемия, тромбоцитопения; головокружение, головная боль, флебит, диарея, боли в животе; диспепсия, анорексия, повышение АСТ, АЛТ, гипербилирубинемия, зуд, сыпь, астения, замедленное заживление ран, абсцессы, инфекции, реакции в месте введения, сепсис; повышение азота мочевины крови, активности щелочной фосфатазы, амилазы, гипопротинемия, пневмония.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДРУГИМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ

Тигацил® совместим с 0,9 % раствором натрия хлорида, 5 % раствором декстрозы для инъекций или раствором Рингера лактат. При применении через Т-образный катетер Тигацил® несовместим с амфотерицином В, амфотерицином В липосомальным, диазепамом, эзометразолом и ометразолом. Тигециклин не подвергается метаболизму посредством изоферментов системы цитохрома P450. Поэтому ожидается, что активные вещества, подавляющие или индуцирующие активность изоферментов системы цитохрома P450, не будут изменять клиренс тигециклина. В свою очередь Тигацил® вряд ли окажет влияние на метаболизм указанных групп лекарственных соединений.

См. полную информацию о препарате в инструкции по медицинскому применению!

*БЛРС – бета-лактамазы расширенного спектра, **MRSA – метициллин-резистентный золотистый стафилококк, ***VRE – ванкомицин-резистентный энтерококк

Ссылки

1. Инструкция по медицинскому применению препарата Тигацил®, одобренная Росздравнадзором 13.10.2009 г., ЛСР-008024/09-081116. 2. И.В.Андреева и другие. Тигециклин- перспективы применения в клинической практике. Клиническая микробиология и антимикробная терапия 2010 том 12, №2. 3. G.L. French A Review of Tigecycline. Journal of Chemotherapy. Vol. 20 - Suppl. n 1 (3-11) - 2008.



ООО «Пфайзер»

Россия, 123112 Москва, Пресненская наб., д.10, БЦ «Башня на Набережной» (Блок С)

Тел.: +7 (495) 287 50 00. Факс: +7 (495) 287 53 00.