

ИНГИБИТОРЫ ТРОМБИНА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

А. А. ПОЯРКОВ¹, Н. А. ТИМОШОК², Н. Я. СПИВАК², С. А. ПОЯРКОВА¹

¹Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;
e-mail: alexp@bpci.kiev.ua;

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев;
e-mail: timoshok@rambler.ru

Проведено исследование цитотоксичности и антибактериальной активности новых ингибиторов тромбина, содержащих ретро-D-последовательность -D-Arg-D-Phe-, модифицированную по аминокетильной группе D-аргинина остатками лауриновой кислоты или хромоном, в сравнении с известным консервантом этиловым эфиром N^α-лауроил-L-аргинина (LAE). Показано, что цитотоксичность Laur-D-Arg-D-Phe-OMe соизмерима с LAE, а Chrom-D-Arg-D-Phe-OMe почти в два раза выше. Антибактериальная активность Laur-D-Arg-D-Phe-OMe по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* близка по действию к LAE. Предполагается, что активность ингибиторов тромбина обусловлена их способностью подавлять активность родственных трипсиноподобных протеиназ, участвующих в процессе инфицирования *S. aureus* и оказывающих влияние на споруляцию *B. subtilis*.

Полученные данные открывают новое направление в поиске эффективных антимикробных средств среди низкомолекулярных синтетических ингибиторов трипсиноподобных протеиназ.

Ключевые слова: ингибиторы тромбина, антибактериальная активность, цитотоксичность, ретро-D-пептиды, N^α-лауроил-L-аргинин этиловый эфир (LAE).

В последние годы установлено, что некоторые известные синтетические антибактериальные препараты обладают антибактериальным действием вследствие эффективного ингибирования бактериальных протеиназ. Поэтому исследование ингибиторов энзимов является перспективным направлением в поиске новых синтетических антибактериальных средств. В настоящее время реализуются несколько направлений в изучении энзимов с целью разработки антибактериальных препаратов [1]. Во-первых, используются так называемые геномные подходы, основанные на изучении структуры генома определенных бактериальных культур, позволяющие обнаружить ранее неизвестные энзимы – потенциальные мишени для создаваемых антибактериальных препаратов. Во-вторых, проводится всестороннее изучение активных центров известных энзимов и разработка комплементарных им соединений – потенциальных ингибиторов. В-третьих, ведется интенсивное изучение целевых энзимов для известных классов лекарственных препаратов, систематизация данных о молекулярных механизмах взаимосвязи структуры и активности (SAR) с последующим моделированием новых структур с более высоким ингибиторным действием по отношению к целевым энзимам.

Наряду с более низкой токсичностью, соединения подобного рода могут превосходить известные предшественники по эффективности действия, спектру биологической активности, фармакокинетическим свойствам [1].

Бактериальные сигнальные пептидазы относятся к классу сериновых протеиназ, ответственных за протеолитическое удаление N-концевого сигнального пептида от секретируемых пропротеинов [2]. Недавно установлено, что *spsB* ген, кодирующий сигнальную пептидазу типа 1 в *Staphylococcus aureus*, важен для бактериального роста [3]. Сигнальные пептидазы присутствуют как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий. Выдвинуто предположение, что у них имеются значительные структурные отличия от их эукариотных аналогов, которые кодируются соответствующими последовательностями ДНК [4].

Поэтому бактериальные сигнальные пептидазы являются основными мишенями для создания новых антибактериальных препаратов. В то же время, ряд ингибиторов биосинтеза бактериальных стенок клетки проявляют антибактериальную активность. Важно упомянуть, что в данный процесс также вовлечены многочисленные энзимы. Например, продукты экспрессии генов *murA*, *murB*, *murG*, и *mraY* являются энзимами, задействованными

в биосинтезе пептидогликанов *Escherichia coli*, и рассматриваются в качестве потенциальных мишеней для разрабатываемых антибактериальных препаратов [4, 5].

Ранее нами показано, что монохлоргидрат этилового эфира N^α-лауроиларгинина (LAE) — известный катионный консервант широкого спектра биологического действия — обладает свойствами конкурентного ингибитора трипсиноподобных протеиназ, в частности — трипсина и тромбина [6]. При этом, LAE также эффективно подавляет рост некоторых микроорганизмов — различных бактерий, грибов и дрожжей. Данное соединение также проявляет инактивирующее действие в отношении поверхностного антигена вируса гепатита В [7]. Как показано, при испытаниях на животных токсичность LAE крайне низка, LD₅₀ составляет 2,0 г/кг [8].

Известен класс протеиновых ингибиторов сериновых протеиназ, обладающих антигрибковым действием. В последние годы появились публикации о важной роли сериновых протеиназ трипсиноподобного действия в процессе инфицирования некоторыми видами грибов [9]. Поэтому мы предположили, что не только LAE, но и синтезированные нами ингибиторы тромбина [10], содержащие ретро-D-последовательность, модифицированные лауриновой кислотой или ароматическим гидрофобным остатком 3-[7-гидрокси-3-(4-метил-1,3-тиазолил-2-ил)-6-этил-4-оксо-4H-хромен-2-ил]пропановой кислотой (хромоном) могут проявлять антигрибковую и антибактериальную активность. Известно, что бактерии рода *Bacillus* являются активными продуцентами различных протеинов. Так, бактерии *B. subtilis* являются активными продуцентами внеклеточных и внутриклеточных субтилаз, среди которых доминирует субтилизинподобная сериновая протеиназа [12, 13]. Относящиеся к группе субтилаз ферменты обладают высокой гомологией структурно-консервативного региона протеиновой глобулы и содержат общие аминокислотные остатки (Asp-32, His-64, Ser-221) [14]. Рентгеноструктурный анализ субтилизинов представителей рода *Bacillus* свидетельствует о структурной идентичности в строении и организации активных центров данных ферментов, что объясняет их схожую субстратную специфичность [15]. Показано, что эти ферменты продуцируются *Bacillus* как в период роста культуры, так и в период споруляции [16]. Важно отметить, что синтез щелочных сериновых протеиназ происходит одновременно с синтезом лектинов, причем секреция протеиназы и

лектинов происходит в культуральных средах, то есть и ферменты, и лектин не связаны с клеткой продуцента. Максимальное накопление протеиназы наблюдается через 16 часов культивирования, а лектина уже через 14 часов [17]. Показано, что при культивировании в среде, содержащей 1 М NaCl, биосинтез субтилизинподобных протеиназ *B. subtilis* повышается [18]. В данной работе культуры *B. subtilis* использовались в качестве тест-культур для исследования некоторых биологических свойств новых ингибиторов сериновых протеиназ. Кроме того установлено, что некоторые грибы, в частности *Aspergillus fumigatus*, вызывающие аспергиллез человека, продуцируют сериновую протеиназу субтилизинового типа [9], а нередко и *Candida albicans*, продуцирующие сериновые протеиназы, проявляют патогенную активность, нередко зависящую от ферментативной активности штамма продуцента [19].

Скрининг новых биологически активных веществ предполагает исследование цитотоксичности и определение их ключевых фармакологических свойств. Согласно данным литературы, эффективность действия антибактериальных препаратов как *in vitro*, так и *in vivo* сохраняется приблизительно в 80% случаев [20].

Целью данной работы является проведение сравнительного анализа цитотоксичной и антибактериальной активности новых ингибиторов сериновых протеиназ (тромбина) в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Синтез, а также антитромбиновая и анти-трипсиновая активность новых синтетических ингибиторов сериновых протеиназ: Laur-D-Arg-D-Phe-OMe, Chrom-D-Arg-D-Phe-OMe и известного консерванта LAE (в качестве препарата сравнения) описаны в работах [6,12]. В настоящей работе исследовали антибактериальные и цитотоксичные свойства этих соединений.

Для оценки антибактериальной активности соединений использовали тест-культуру штамма *S. aureus 209p* депонированного в депозитарии Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины за № В-4001, American type culture collection — ATCC 6538 P, FDA 209-P, а также культуры *B. subtilis 3*, *B. licheniformis 31* и *B. subtilis 44-p*, полученные из Института сельскохозяйственной микробиологии УААН.

Препараты растворяли в питательной среде (1 мг/мл), а нерастворимое в воде соедине-

ние (Chrom-D-Arg-D-Phe-OMe) растворяли сначала в 3%-м водном растворе диметилсульфоксида (ДМСО) и затем разводили питательной средой. Минимальные бактериостатические концентрации (МБстК) препаратов по отношению к тест культурам определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде в соответствии с рекомендациями NCCLS [21] при визуальной регистрации видимого роста.

Использовали питательные среды: мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА) (рН 7,2–7,4) для культуры *S. aureus 209p*, а также среду Гаузе и МПА для культивирования культур аэробных спорообразующих бактерий. Микробная нагрузка *S. aureus 209p* и опытных культур составляла (1×10^5 кл/мл).

Из прозрачных пробирок, содержащих МПБ, исследуемый препарат и *S. aureus 209p*, а также пробирок, содержащих среду Гаузе, бактерии рода *Bacillus* и препарат делали контрольные посевы на чашки Петри с 2% МПА. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 5 суток. Отсутствие роста на агаре показывало минимальную бактерицидную концентрацию препаратов (МБцК) к *S. aureus 209p* и культурам *B. subtilis 3*, *B. licheniformis 3*, *B. subtilis 44-p*. Все опыты проводили в 2–3-кратной повторности.

Изучение токсичности исследуемых ингибиторов проводили в системе *in vitro* в монослое культуры клеток перевиваемых тестикулов поросенка (ПТП), взятых из коллекции отдела проблем интерферона и иммуномодуляторов Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, или в суспензии спленоцитов мышей [11]. Культуры клеток культивировали в питательной среде 199, которая содержала 10% прогретой при 56 °С на протяжении 30 мин эмбриональной сыворотки телят и антибиотики (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина).

Через 24 и 48 часов инкубации проводили подсчет клеток и определение их жизнеспособности после окрашивания их водным раствором витального красителя (трипановый синий). При отсутствии токсичного эффекта клетки усваивали витальный краситель. Окраску контрольных культур принимали за 100%. Разведение препарата, которое вызывало усвоение красителя на 50%, считали токсичным. Изучение ориентировочных показателей токсичности для соединений с наибольшей антимикробной активностью проводили согласно [22].

Результаты и обсуждение

Как известно, тромбин (ЕС 3.4.21.5) играет ключевую роль в гомеостазе, участвуя в регуляции процессов, направленных как на свертывание крови, так и на поддержание ее жидкого состояния в кровяном русле [23]. Он является терапевтической мишенью для создания антикоагулянтов прямого действия, потенциально эффективных в терапии тромбоемболических заболеваний. Тромбин обладает широким спектром биологического действия. Он специфически взаимодействует с многими клетками крови, соединительной и нервной ткани, связываясь с лейкоцитами, активирует систему комплемента. Кроме того, он индуцирует хемотаксис моноцитов, синтез ДНК и пролиферацию фибробластов, эндотелиальных и других клеток комплемента [24, 25]. Тромбин, модифицируя липопротеиновые рецепторы, оказывает влияние на развитие атеросклероза [26], усиливает инфицирование некоторыми респираторными вирусами [27], участвует в развитии опухолей и метастазирования [28]. Учитывая тот факт, что тромбин усиливает инфицирование некоторыми вирусами, по видимому, опосредованное активацией вирусных проэнзимов, представлялось интересным изучить влияние ингибиторов этого фермента на жизнедеятельность некоторых бактерий. Коль скоро в процессе активации некоторых вирусов и бактерий принимают участие еще неизвестные сериновые протеиназы трипсиноподобного действия, то весьма вероятно подавление ингибиторами этих ферментов жизнедеятельности некоторых бактерий и вирусов. Ввиду высокой активности новых ингибиторов, синтезированных на основе ретро-D пептидной последовательности -D-Arg-D-Phe-OMe [6,10], представлялось целесообразным исследование их антимикробного действия.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, максимальным ингибиторным эффектом на амидолитическую активность тромбина обладает соединение Laur-D-Arg-D-Phe-OMe, модифицированное остатком лауриновой кислоты. Соединение Chrom-D-Arg-D-Phe-OMe, содержащее в своей структуре остаток хромо-на, ингибирует на порядок слабее.

Поскольку LAE является известным и хорошо изученным консервантом с высоким антибактериальным и антигрибковым действием, мы решили исследовать способность дипептидного производного лауриновой кислоты и дипептида, содержащего остаток хромо-на вместо остатка жирной кислоты, подавлять рост неко-

Таблиця 1. Антитромбинова активність (K_i) сполучень

| Соединение | Структурная формула | K_i , мкМ |
|------------------------|---------------------|-----------------|
| Chrom-D-Arg-D-Phe-OMe* | | $14,3 \pm 0,9$ |
| Laur-D-Arg-D-Phe-OMe | | $1,76 \pm 0,09$ |
| LAE | | $2,00 \pm 0,02$ |

Примечание: измерения проводили в 0,05М трис-НСl буфере, рН 8,0, содержащем 0,15 М NaCl, при 25 °С.
*Буфер содержит 3% ДМСО в конечной концентрации.

торых микроорганизмов и изучить другие их фармакологически важные свойства.

Как известно, уровень токсичности является одним из важнейших характеристик биологически активных веществ.

Цитотоксичность новых ингибиторов оценивали по снижению жизнеспособности эукариотических клеток ПТП и спленоцитов мыши под их влиянием.

При изучении токсичности исследуемых ингибиторов также было установлено, что эти

соединения в дозах 10–75 мкг/мл нетоксичны для культур лимфоцитов селезенки мышей и клеток культуры ПТП. Снижение жизнеспособности указанных клеток на 30% наблюдалось лишь при повышении дозы препаратов от 75 до 150 мкг/мл (табл. 2)

Спленоциты мыши оказались более устойчивыми к токсичному действию препаратов, чем клетки ПТП. Как следует из данных, приведенных в таблице 2, цитотоксичность LAE и Laur-D-Arg-D-Phe-OMe одинаковая и

Таблица 2. Цитотоксичные свойства препаратов ингибиторов тромбина

| Препараты | Цитотоксичная доза, мкг/мл | |
|-----------------------|---|-----------------|
| | Культура клеток перевиваемых тестикулов поросенка | Спленоциты мыши |
| Chrom-D-Arg-D-Phe-OMe | 75 | 150 |
| Laur-D-Arg-D-Phe-OMe | 150 | 200 |
| LAE | 150 | 200 |

по значению ниже токсичности Chrom-D-Arg-D-Phe-OMe.

Главным показателем антибактериальной активности препаратов было бактериостатическое действие по отношению к *S. aureus 209p*. Известно, что этот штамм чувствителен к антибиотикам – пенициллину, стрептомицину, биомицину, окситетрациклину, полимиксину, макролидам, фторхинолонам, аминогликозидам, ванкомицину. Тем не менее, в литературе отсутствуют данные относительно чувствительности этого тест-штамма к ингибиторам сериновых протеиназ. Проведенные исследования показали, что ингибиторы протеиназ проявляют значительную антибактериальную активность, поскольку контакт *S. aureus 209p* с исследуемыми препаратами сопровождается снижением жизнеспособности указанного тест-штамма.

Расчет результатов антимикробной активности проводили согласно методическим рекомендациям [29].

Испытание препаратов начинали с концентрации 100 мкг/мл, в дальнейшем дозу препаратов уменьшали. Результаты антибактериальной активности препаратов приведены в табл. 3.

Как видно, исследуемые вещества задерживают рост разных бактериальных культур (*S. aureus 209p*, *B. subtilis 3*, *B. licheniformis 31* и *B. subtilis 44-p*).

Проведенные исследования показали, что бактерицидные концентрации препаратов колеблются в зависимости от вида и штамма бактериальных культур (табл. 4).

Изучение прямого антибактериального действия исследуемых препаратов на международный стандарт *S. aureus 209p* показало, что жизнеспособность тест-штамма зависит от времени контакта с препаратами. Продолжительный контакт *S. aureus 209p* с препаратами сопровождается усилением бактерицидного действия. Так, результаты пересевов тест-штамма из пробирок на чашки с МПА через 24 часа инкубации свидетельствуют об уменьшении бактерицидной концентрации препаратов по сравнению с концентрацией при двухчасовом контакте. Для большинства препаратов при двухчасовом контакте бактерицидность проявляется при концентрации 25 мкг/мл, а через 12 часов контакта при 15 мкг/мл. Таким образом, можно сделать вывод, что антибактериальная активность препаратов варьирует в широких пределах и находится в прямой зависимости от времени контакта *S. aureus 209p* с препаратом.

Важным результатом исследований является определение оптимальной дозы препаратов – 25 мкг/мл. Полученные результаты согласуются с данными литературными по LAE, антибактериальные свойства которого хорошо изучены. Установлено, что подавление LAE

Таблица 3. Величины МБстК (в мкг/мл) исследуемых соединений в отношении *Staphylococcus aureus 209p*, композиции культур (*Bacillus licheniformis 31* и *Bacillus subtilis 3*) и *Bacillus subtilis 44-p*

| Культуры микроорганизмов | Конечная концентрация препаратов, мкг/мл | | | | | | | |
|---|--|----|----|-----|------|----|----|-----|
| | Laur-D-Arg-D-Phe-OMe | | | | LAE | | | |
| | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 12,5 | 25 | 50 | 100 |
| <i>S. aureus 209p</i> | н | – | – | – | н | – | н | – |
| <i>B. subtilis 3</i> , <i>B. licheniformis 31</i> | + | – | н | н | н | – | – | – |
| <i>B. subtilis 44-p</i> | н | – | – | – | н | – | н | – |

Примечание: – отсутствие роста; + наличие роста культуры; н – не исследовано. Микробная нагрузка 2×10^5 кл/мл.

Таблиця 4. Величини МБцК (в мкг/мл) досліджуваних сполучень в отношении *Staphylococcus aureus* 209p, композиції культур (*Bacillus licheniformis* 31, *Bacillus subtilis* 3) і *Bacillus subtilis* 44-p

| Культури мікроорганізмів | Конечная концентрация препаратів, мкг/мл | | | | | |
|--|--|----|-----|-----|----|-----|
| | Laur-D-Arg-D-Phe-OMe | | | LAE | | |
| | 25 | 50 | 100 | 25 | 50 | 100 |
| <i>S. aureus</i> 209p | + | + | – | – | н | – |
| <i>B. subtilis</i> 3, <i>B. licheniformis</i> 31 | – | н | н | – | – | – |
| <i>B. subtilis</i> 44-p | – | – | – | – | н | н |

Примечание: – відсутність росту при висеві на МПА; + наявність бактеріального росту при висеві на МПА; н – не досліджено.

S. aureus обумовлено пошкодженням мембрани бактеріальної клітки [8].

Предположение о том, что бактериостатическая активность препаратів частинно обумовлена подавленням активності субтилізиноподібних протеїназ, біосинтез котрих зв'язують со споруляцією бацилл [30], косвенно підтверджується даними об інгібуванні росту цих аеробних спорообразующих бактерій як LAE, так і іншими синтетическими інгібіторами протеїназ.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о бактериостатическом и бактерицидном действии исследуемых ингибиторов тромбина, что, по всей видимости, обусловлено ингибированием сериновых протеїназ, продуцируемых *B. subtilis*. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего поиска препаратів, обладающих антибактеріальной активностью среди низкомолекулярных синтетических ингибиторов сериновых протеїназ тромбиноподобного действия.

ІНГІБІТОРИ ТРОМБІНУ, ЩО ВІЯВЛЯЮТЬ АНТИБАКТЕРІАЛЬНУ ДІЮ

О. О. Поярков¹, Н. О. Тимошок²,
М. Я. Співак², С. О. Пояркова¹

¹Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: alexp@bpci.kiev.ua

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: timoshok@rambler.ru

Проведено дослідження цитотоксичної та антибактеріальної дії нових інгібіторів тромбіну, що містять ретро-D-послідовність -D-Arg-D-Phe-, модифіковану за аміногрупою D-аргініну залишками лауринової кислоти

або хромоном. Встановлено, що цитотоксичність Laur-D-Arg-D-Phe-OMe така ж сама, як і в етилового ефіру N^α-лауроїл-L-аргініну (LAE), а токсичність Chrom-D-Arg-D-Phe-OMe майже вдвічі вища. Антибактеріальна дія Laur-D-Arg-D-Phe-OMe по відношенню до *Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis* близька до такої LAE. Висловлюється припущення, що подібна дія інгібіторів тромбіну обумовлена їхньою здатністю пригнічувати активність трипсиноподібних протеїназ, що беруть участь в інфікуванні *S. aureus* та впливають на спорогенез *B. subtilis*.

Одержані дані відкривають новий напрям пошуку ефективних антимікробних засобів серед низькомолекулярних синтетических інгібіторів трипсиноподібних протеїназ.

Ключові слова: інгібітори тромбіну, антибактеріальна дія, цитотоксичність, ретро-D-пептиди, етиловий ефір N^α-лауроїл-L-аргініну (LAE).

THROMBIN INHIBITORS WHICH DISPLAY ANTIBACTERIAL ACTIVITY

A. A. Poyarkov¹, N. A. Timoshok²,
M. Ya. Spivak², S. A. Poyarkova¹

¹Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: alexp@bpci.kiev.ua;

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: timoshok@rambler.ru

Summary

The investigation of cytotoxicity and antibacterial activity of the novel thrombin inhibitors containing retro-D-sequences -D-Arg-D-Phe – modified by D-arginine amino group by the residues of lauric acid or chromone-contained substituent, in comparison with known cationic preservative

N^α-lauroyl-L-arginine ethyl ester (LAE) have been carried out. It has been shown that compound Laur-D-Arg-D-Phe-OMe has a similar cytotoxicity with LAE, and Chrom-D-Arg-D-Phe-OMe has almost twice higher toxicity than it fatty moiety contained analogues. Antibacterial activity of Laur-D-Arg-D-Phe-OMe against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* is close in action to LAE. It is assumed that ability of thrombin inhibitors to suppress the growth of some microorganisms can be explained by their ability to suppress activity of trypsin-like serine proteinases, which participate in the infection process of *Staphylococcus aureus* and influence on *Bacillus subtilis* sporulation.

These findings open new prospects for exploring efficient antimicrobial agents among synthetic low-molecular trypsin-like serine proteinase inhibitors.

Key words: thrombin inhibitors, antibacterial activity, cytotoxicity, retro-D-peptide, N^α-lauroyl-L-arginine ethyl ester (LAE).

1. Roychoudhury S. / In Enzyme technologies for pharmaceutical and biotechnology application. — Ed. by H. A. Kirst. Wu-Kuang Yeh, Milton J. Zmijewski, Jr. — 2001. — P. 245–263. by Marcel Dekker, Inc. <http://www.dekker.com>
2. Black M. T., Burton G. // Curr. Pharm. Des. — 1998. — 2. — P. 133–154.
3. Cregg K. M., Wilding I., Black M. T. // J. Bacteriol. — 1996. — 178. — P. 5712–5718.
4. Skarzynski T., Mistry A., Wonacott A. et al. // Structure. — 1996. — 4. — P. 1465–1474.
5. Benson T. E., Walsh C. T., Hogle J. M. // Ibid. — P. 47–54.
6. Поярков А. А., Пояркова С. А., Кухарь В. П. // Укр. біохім. журн. — 2007. — 79, № 1. — С. 87–94.
7. Sugimoto Y., Toyoshima S. // Antimicrob. Agents Chemother. — 1981. — 20. — P. 120–127.
8. Ruckman S. A., Rocabayera X., Borzelleca J. F., Sandusky C. B. // Food Chem. Toxicol. — 2004. — 42. — P. 245–259.
9. Дэвис Д. А., Калинина Н. А., Самохвалова Л. В. и др. // Биоорган. химия. — 2005. — 31, № 3. — С. 259–268.
10. Poyarkov A. A., Rocabayera X., Poyarkova S. A., Kukhar V. P. // Open Biochem. J., Bentham. — 2008. — 2. — P. 143–149.
11. Абдувалиев А. А., Гильдиева М. С. // Клин. лабор. диагн. — 2006. — № 2. — С. 36–37.
12. Mala B. Rao, Aparna M. Tanksale, Mohini S. Ghatge, Vasanti V. Deshpande // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1998. — 62, N 3. — P. 597–635.
13. Nugroho F. A., Yamamoto H., Kobayashi Y., Sekiguchi J. // J. Bacteriol. — 1999. — 181, N 20. — P. 6230–6237.
14. Siezen R. J., Vos W. M., Leunissen J. A. M., Dijkstra B. W. // Protein Eng. — 1991. — 4. — P. 719–737.
15. Siezen R. J., Leunissen J. A. M. // Protein Sci. — 1997. — 6. — P. 501–523.
16. Кириллова Ю. М., Михайлова Е. О., Балабан Н. П. и др. // Микробиология. — 2006. — 75, № 2. — С. 179–185.
17. Kudria V. A., Simonenko I. A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1994. — 41, N 5. — P. 505–509.
18. Kunst F., Rapport G. // J. Bacteriol. — 1995. — 175, N 9. — P. 2403–2407.
19. Vanerjee A., Ganesan K., Datta A. // J. Gen. Microbiology. — 1991. — 137. — P. 2455–2461.
20. Шорин В. А. // Антибиотики. — 1958. — № 6. — С. 113–116.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically / Approved standart M7-A4. / 4th ed Villanova.
22. Методы испытания и оценки противовирусной активности химических соединений в отношении вируса гриппа. Метод указания. Составил проф. В. И. Ильенко. — Л., 1977. — 35 с.
23. Fenton J. W., Ofosu F. A., Moon D. G., Maragano J. M. // Blood Coagul. Fibrinolysis. — 1991. — 2(1). — P. 69–75.
24. Bar-Shvit K. A., Hruska A. J., Kahn G. D., Wilner R. // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1986. — 485. — P. 335–348.
25. Shuman M. A. // Ibid. — P. 228–239.
26. Giaturco S. H., Bradley W. A. // Semin. Thromb. Hemost. — 1986. — 12, N 4. — P. 277–279.
27. Dubovi E. J., Geratz J. D., Tidwell R. R. // Infect. Immunol. Hemost. — 1986. — 12, N 4. — P. 294–307.
28. Goldfarb R. H., Liotta L. A. // Semin. Tromb. Hemost. — 1986. — 12, N 4. — P. 294–307.
29. Методические указания МУК 4.2.1890-04. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2004. — 6, № 4. — С. 306–359.
30. Errington J. // Microbiol. Rev. — 1993. — 57, N 1. — P. 1–33.

Получено 14.12.2009