

Х И М И Я

Академик В. И. Исагулянц

П е н и ц и л л и н

новый антибактериальный препарат

Начало XX в. ознаменовалось получением и применением большого количества чрезвычайно интересных, новых, хемотерапевтических средств, являющихся в основном синтетическими препаратами. Сюда относятся, в первую очередь, сальварсановые препараты, противомаларийные (акрихин, плазмодид) препараты, препараты барбитуровой кислоты и, наконец, сульфамидные препараты—стрептоцид, сульфидин и сульфазол.

Почти все синтетические препараты наряду с их прекрасными лечебными свойствами вызывают одновременно побочные явления. Поэтому стремление химиков-исследователей имеет своей целью наряду с получением эффективных хемотерапевтических средств получить их в виде, максимально безвредном для макроорганизма.

Особенное значение приобретают средства, которые могут быть использованы внутривенно при тяжелых случаях бактериального заражения крови (сепсисе), не вызывая при этом гемолиза.

Наряду с препаратами, полученными путем синтеза, появился интерес к препаратам, получаемым в результате микробиологических процессов. Сюда относятся, например, препараты, названные фагами.

В 1929 г., изучая действие различных микроорганизмов на стафилококки, английский ученый Флеминг¹ установил, что некоторые виды пенициллиумов способны вырабатывать весьма эффективные антибактериальные средства, которые способны задержать или полностью остановить рост стафилококка. Это наблюдение Флеминга осталось без особого внимания почти в течение 10 лет. В 1939 году американский микробиолог Дюбо² открывает новое направление в вопросе получения хемотерапевтических препаратов, используя для этой цели явления антагонизма у микробов. Эти новые хемотерапевтические препараты получают в результате жизнедеятельности различных микроорганизмов. К числу таковых, кроме пенициллина, относятся новые антибактериальные средства, как, например, грамицидин, выделяемый из культур бактерий-антагонистов, проактиномицин, получаемый из грибка проактиномицес. Бактериостатический эффект грамицидина, пенициллина и проактиномицина очень велик, но неодинаков. Грамицидин по бактериостатическому эффекту по отно-

шению к стафилококку почти в два раза слабее пенициллина и проактиномицина, а пенициллин по бактериостатическому эффекту несколько уступает проактиномицину. В это же время работами Флеминга начинает интересоваться ряд ученых различных специальностей, начиная от микробиологов и кончая медиками и химиками.

В настоящее время вопросом получения и изучения свойств пенициллина в Англии занято несколько групп исследователей, из которых следует отметить: Abraham E. P., Chain E., Holiday E. R., Robinson R., Fletcher C. M., Florey H. W., Gardner A. D., Heatley N. G., Jennings M. A., Fleming A. и др.

Уже в 1941 г. в Англии, на основании многочисленных предварительных исследований, Абрагам³ с сотрудниками организовал полувыводское получение пенициллина, который стали применять в качестве эффективного антибактериального средства при лечении ран, инфицированных патогенными микробами: стафилококк, стрептококк, менингококк, пневмококк. Основное применение пенициллин нашел в следующих областях: инфицированные кокками раны, гнойничковые заболевания кожи, инфицированные кокками заболевания глазной полости, ожоги кожи.

Сравнительное изучение действия пенициллина и сульфамидных препаратов показало, что пенициллин действует значительно эффективнее сульфамидных препаратов и почти не вызывает побочных явлений.

Применяется пенициллин наружно, подкожно, внутримышечно и внутривенно.

Препараты пенициллина применяются в виде водных растворов и в виде мазей. Существует ряд препаратов пенициллина: пенициллин Абрагама, пенициллин А., аспергиллин, клавиоформин, нотатин и др. Все они обладают эффективным антибактериальным свойством. Из них наиболее изучен пенициллин Абрагама, который производится в Англии. В настоящее время трудно иметь окончательное суждение о химической идентичности различных препаратов пенициллина, тем более, что различные виды препаратов пенициллина получают из различных штаммов пенициллиумов. Возможно, что имея в основном одну и ту же структуру, различные препараты пенициллина отличаются друг от друга наличием различных функциональных групп.

Исключительные антибактериальные свойства пенициллина вызвали громадный интерес к нему.

Кроме работ, проводимых в Англии (Оксфордская группа Абрагама, Чен и др.), в настоящее время обширные исследования по получению пенициллина проводятся в США⁴ (где этим вопросом занято 16 коммерческих лабораторий, среди которых можно упомянуть лаборатории: Merck, Squibb, C. Pfizer и др.) под руководством и при содействии комитета медицинского исследования и национального исследовательского совета при министерстве земледелия. Получение пенициллина рассматривается в США как одно из мероприятий, на-

правленных в пользу вооруженных сил США. Несмотря на большие усилия, в США, как и в Англии, получение пенициллина не доведено до производственного масштаба. В большинстве случаев пенициллин получают в лабораторном или опытном масштабе. Увеличение производства пенициллина лимитируется трудностью процесса получения пенициллина (выбор наиболее продуктивных штаммов, подходящих питательных сред, выбор способов экстрагирования, очистки и сохранения готового пенициллина). Из 20 литров питательной среды получается максимум 1 г очищенного пенициллина в виде порошка.

Исследование пенициллина в США ведется в 20 лабораториях и субсидируется по договору с Office of Scientific Research and Develop.

Клиническое испытание пенициллина, под руководством главного хирурга Армии США, сосредоточено в главном госпитале Buschneell Brigham Utah.

К половине 1943 г. в США пенициллином весьма успешно пользовались свыше 300 больных, причем он оказался более эффективным, чем сульфамидные препараты при лечении следующих заболеваний: инфекции от стафилококка (без бактериемии и с ней), включая острый и хронический остеомиелит, карбункулы на губах и на лице, пневмония и эмпиема, инфильтрированные раны и ожоги, инфекции от гемолитического стрептококка, пневмококка и гонококковые заражения, которые не поддавались лечению сульфамидными препаратами.

Методы получения пенициллина

Флеминг установил, что пенициллин является химическим соединением, которое образуется в процессе роста грибов *Penicillium*. Абрагам считает, что наиболее эффективный препарат пенициллина вырабатывают грибки *Penicillium notatum* Westlings.

Для выращивания грибов *Penicillium* применяются различные питательные среды. Наилучшей питательной средой является мед. Штаммы *Penicillium* разводятся на агаре с медом. Однако, как показали опыты Флеминга и Абрагама, для размножения штаммов *Penicillium* с успехом может применяться искусственная среда Чапек-Докс следующего состава:

NaNO_3	—	3	г
KH_2PO_4	—	1	г
KCl	—	0,5	г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	0,5	г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	0,01	г
Глюкоза	—	40,0	г
Вода	—	1	л

Могут быть использованы для выращивания *Penicillium* и другие естественные и искусственные питательные среды.

Выращивать грибки пенициллина можно в различных сосудах. Лучше всего применять чашки типа чашек Петри, стеклянные или глиняные с глазурью.

Получение пенициллина по Абрагаму⁵

Стерилизованная питательная среда засеивается спорами пенициллиума. Через 7—10 дней со дня посева рост считается законченным, и вся поверхность питательной среды в чашке покрывается плесенью в виде пленки. Питательная среда отделяется от плесени, фильтруется и подвергается процессу очистки.

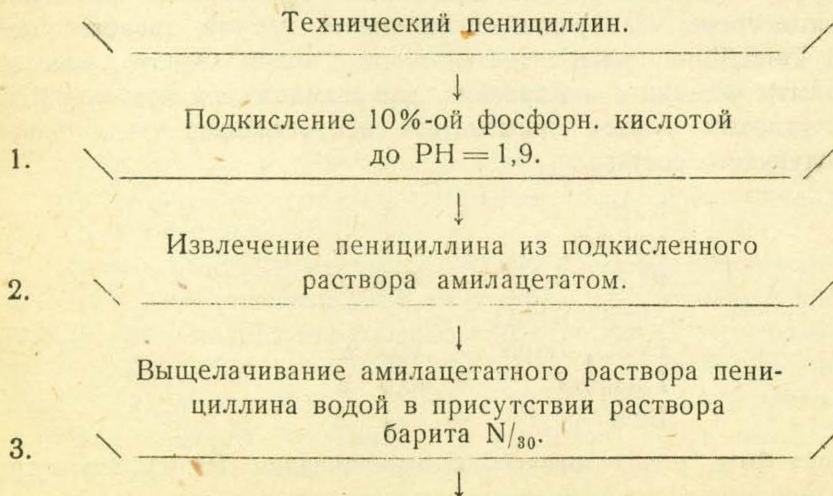
Сущность процесса очистки⁶ или выделения пенициллинового концентрата из питательной среды сводится к следующему: питательная среда (антибактериальная активность 0,3—0,5 оксфордских единиц) извлекается сначала растворителями этил- или амилацетатом, из которого пенициллин выщелачивается снова небольшим объемом воды. Водный концентрат пенициллина обрабатывается животным углем, после чего отфильтрованный от угля депигментированный раствор пенициллина экстрагируется эфиром.

Эфирный экстракт подвергается 2-кратной хроматографической очистке в колонке с активированной окисью алюминия. На этой ступени очистки активность пенициллина достигает 150 оксфордских единиц.

Для дальнейшей очистки пенициллин подвергается восстановлению амальгамой алюминия, что дает возможность повысить активность пенициллина до 300 оксфордских единиц.

Для получения наиболее активного пенициллина полученный после реакции восстановления пенициллин подвергается 2—3-кратной хроматографической очистке, после чего активность пенициллина достигает 480—500 оксфордских единиц.

Схема очистки технического раствора пенициллина



4. \ _____ /
Депигментация водного выщелоченного
из амилацетата раствора бариевой соли
пенициллина животным углем.
↓
5. \ _____ /
Подкисление 10%-ой фосфорной кислотой
до $\text{pH} = 1,9$ депигментированного водного
раствора бариевой соли пенициллина и извле-
чение свободного пенициллина эфиром.
↓
6. \ _____ /
Предварительная хроматографическая очистка
эфирного раствора пенициллина в колонке
с активированной окисью алюминия.
↓
7. \ _____ /
Хроматограммы.
↓ ↓ ↓ ↓
№ 1 № 2 № 3 № 4
8. \ _____ /
Обработка слоя № 2 хроматограммы фос-
фатным буфером ($\text{pH} = 7 \text{ M}/15$) — извлечение
пенициллина.
↓
9. \ _____ /
Подкисление извлеченного с хроматограммы
раствора пенициллина 10%-ой фосфорной
кислотой до $\text{pH} = 2$ и извлечение из него
пенициллина эфиром.
↓
10. \ _____ /
Выщелачивание пенициллина из эфирного
раствора водой в присутствии N/30 барита.
↓
11. \ _____ /
Извлечение пенициллина эфиром из подкислен-
ного 10%-ой фосфорной кислотой раствора
бариевой соли пенициллина.
↓
12. \ _____ /
Повторная хроматографическая очистка
эфирного раствора пенициллина в колонке
с активированной окисью алюминия.
↓ ↓ ↓ ↓
№ 1 № 2 № 3 № 4

Механическое отделение и обработка слоя
№ 2 хроматограммы фосфатным буфером —
извлечение пенициллина.

13.

Повторение операций № 9, 10, 11.

Химия пенициллина

До настоящего времени в отношении химического строения пенициллиновых препаратов подвергнуты изучению: пенициллин, образующийся в процессе роста пенициллиум нотатум и пенициллиум клавиоформиум. Как известно, оба эти препарата обладают антибактериальными свойствами, хотя по элементарному составу они значительно отличаются друг от друга. Для бариевой соли пенициллина предложена формула $C_{24}H_{32}O_{10}N_2Ba$, в то время как клавиоформин отвечает формуле $C_9H_8O_5$. Как видно из предложенных формул, они отличаются также и по молекулярному весу. Молекулярный вес пенициллина равен 645, в то время как молекулярный вес клавиоформина равен 192.

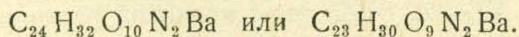
Абрагам, Чен⁶ подвергли довольно подробному изучению хорошо очищенную бариевую соль пенициллина (450—500 оксфордских единиц) и установили следующие физические и химические свойства пенициллина:

1. При выпаривании бариевой соли пенициллина при температуре $100^\circ C$ последняя теряет в весе 6,5%.

2. По данным элементарного анализа, для пенициллина найдено: $C = 44,3\%$; $H = 4,85\%$; $N = 4,13\%$; $Ba = 22,0\%$; $C - Me = 11,6\%$. S, P, галоиды, OMe-группы — отсутствуют.

Ацетилирование пенициллина уксусным ангидридом⁷ и обратное титрование уксусной кислоты указывает на возможное наличие в молекуле двух ацетилируемых групп на атом бария (или на присутствие двух атомов активного водорода).

На основании приведенных данных для бариевой соли пенициллина предложены следующие две общие формулы:



3. Путем электрометрического титрования (применялся элемент с водородным электродом) было установлено, что пенициллин является сильной двусосновой кислотой, с константой диссоциации (для различных образцов препарата), колеблющейся в пределах 2,3—3,5.

4. Пенициллин при нагревании до 100° в течение 1—2 часов выделяет CO_2 . Для наиболее чистых образцов потеря CO_2 соответствовала одной молекуле на атом Ba. При этом почти нацело теряется активность препарата.

5. Пенициллин теряет свою активность, вступая в реакцию с большинством катионов. Механизм такой инактивизации не выяснен;

возможно, что при этом наряду с солеобразованием имело место и комплексообразование. Активность не могла быть восстановлена при разложении инактивизированного катионами пенициллина кислотой и экстрагировании его эфиром.

6. При кристаллизации Ва-соли из метилового спирта было установлено, что при нагревании до 50°C пенициллин в растворе метилового спирта полностью терял свою активность. Точно такое же явление наблюдалось и с другими первичными спиртами: этиловым, бензиловым и этиленгликолем. Повидимому, в данном случае имело место образование эфиров (?), так как в случае метилового спирта в инактивизированном препарате удалось установить присутствие метоксильных групп.

Попытка восстановить активность пенициллина, инактивизированного метиловым спиртом, путем обработки его водой при температуре 37°C , оказалась безуспешной.

7. Аммиак, анилин и хинин в водных растворах не реагируют с пенициллином, и активность последнего не изменяется. Однако, при пропускании сухого NH_3 через эфирный раствор пенициллина выпадал белый осадок, не обладающий антибактериальными свойствами. Пенициллин терял свою активность (частично) при взаимодействии его в эфирном растворе с анилином и хинином.

8. По отношению к атмосферному кислороду водный раствор пенициллина весьма устойчив, если его $\text{Ph} = 5 - 7$. Активный кислород (действие перекиси водорода, органических перекисей, раствора перманганата калия), наоборот, легко окисляет пенициллин с потерей активности его.

Раствор Фелинга при взаимодействии с очищенными препаратами пенициллина не образует закиси меди; имеет место только изменение синего цвета раствора Фелинга до зеленого.

При взаимодействии с щелочным раствором синеродистого железа⁸ пенициллин окисляется, и по количеству образовавшегося закисного синеродистого железа установлено, что в пенициллине имеется наличие четырех восстанавливающих эквивалентов на атом Ва. При этом установлено, что, если предварительно пенициллин прокипятить в течение 30 минут в растворе N/HCl или даже в нейтральном водном растворе, восстанавливающая способность его снижается примерно вдвое.

9. Опыты гидрогенизации пенициллина с катализатором палладий на угле (по Варбургу) при 37° не показали поглощения водорода.

С катализатором Адамса пенициллин, при гидрировании в течение 4,5 часов, поглотил около 0,8 молекул H_2 , не изменив при этом своей активности.

10. Пенициллин реагирует с гидразином, бисульфитом натрия и гидроксиламином, теряя при этом активность.

Путем количественного определения вступившего в реакцию с пенициллином гидроксиламина установлено, что это количество

соответствует примерно 0,8 эквивалента на атом Ва. Это указывает на присутствие в пенициллине по меньшей мере одной карбонильной группы.

11. Серебряная соль пенициллина реагирует с алкилиодидами и арилиодидами с выделением иодистого серебра. Однако, образовавшиеся при этом эфиры имели сильно кислую реакцию и требовали на нейтрализацию примерно 1 эквивалент щелочи на атом Ag. Надо полагать, что эфиры пенициллина в момент образования легко омыляются. Удалось, применяя хроматографический метод очистки, выделить кислоту пенициллина в чистом виде, которая уже не обладала антибактериальной активностью.

Несколько позже удалось получить эфиры⁹ при действии на пенициллин диазосоединениями жирного ряда. Так были получены метиловый, этиловый, бутиловый и бензогидрильный эфиры пенициллина. Алифатические эфиры проявляют меньшую антибактериальную способность *in vitro* по сравнению с исходным пенициллином. Антибактериальная активность, однако, значительно выше при испытании *in vivo*.

12. Бариевая соль пенициллина подвергается расщеплению при нагревании в течение 1 часа при 100° С.

При этом образуется новое соединение основного характера, отвечающее формуле $C_6H_{11}O_4NHCl$. Этот продукт, являющийся продуктом распада пенициллина, назван пеницилл-амином¹⁰.

13. Свободный пенициллин очень хорошо растворяется в воде, эфире, ацетоне, этил- и амилацетате, циклогексаноне и диоксане. Он растворим в первичных спиртах, но при этом реагирует с ними, теряя свою активность.

Хуже растворим в бензине, хлороформе и четыреххлористом углеороде. Гигроскопичен; на воздухе, поглощая воду, быстро инактивируется.

Соли пенициллина, натровая, калиевая, аммониевая также весьма гигроскопичны. Бариевая соль не гигроскопична, не изменяет при хранении своих свойств.

Из катионов тяжелых металлов только окисное железо дает осадок с раствором натровой соли пенициллина. Кроме того, дают аморфные осадки, с раствором натровой соли пенициллина, некоторые алкалоиды и красители. Щелочные и щелочно-земельные соли пенициллина легко растворяются в абсолютном метиловом спирте, но не растворимы в абсолютном этиловом спирте.

Из изложенного по вопросу о химических свойствах пенициллина можно сделать следующие предварительные предположения о строении пенициллина.

Пенициллин представляет собою сложную органическую дикарбоновую кислоту и содержит два атома азота. Содержание азота определяет антибактериальную активность препарата. Недостаточно очищенный пенициллин содержит меньше (чем 2 атома) азота на мо-

лекулу и соответственно менее активен. Совершенно определенно установлено присутствие в молекуле: одной карбонильной группы, двух ацетилируемых групп (2 атома активного водорода) и одной скрытой карбоксильной группы. Небольшое содержание в молекуле водорода и отсутствие легко гидрогенизируемых двойных связей позволяет предполагать, что молекула содержит несколько конденсированных колец. Наличие большого количества кислорода в молекуле позволяет считать, что кислотные группы являются карбоксильными.

То обстоятельство, что при обработке пенициллина амальгамой алюминия и отделением пенициллина от выделившейся гидроокиси алюминия повышается антибактериальная активность пенициллина, выраженная в оксфордских единицах, позволяет считать, что при этой операции подвергается изменению не молекула пенициллина, а сопровождающие ее примеси.

С другой стороны, наличие в молекуле трудногидрируемой двойной связи, повидимому, не определяет антибактериальных свойств пенициллина, поскольку после гидрогенизации пенициллина, по Адамсу, активность пенициллина не падает. Этот вывод может иметь важное значение в последующее время, в работах по синтезу пенициллина.

Все полученные данные по вопросу о физико-химических свойствах пенициллина и его строения могут служить лишь предварительным ориентирующим материалом.

Не исключая возможности приготовления пенициллина в больших количествах в ближайшие годы биологическим методом, радикальное разрешение вопроса производства пенициллина возможно лишь тогда, когда, изучив строение пенициллина, удастся синтезировать пенициллин или аналогичные пенициллину, по своему строению, препараты, обладающие такими же антибактериальными свойствами, как и сам пенициллин.

Данные о химической структуре пенициллина уточнены и дополнены спектрографическим исследованием пенициллина различной степени чистоты.¹¹

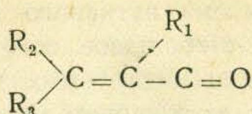
На основании данных, полученных в результате изучения спектра абсорбции различных препаратов пенициллина, установлено:

1. Интенсивность абсорбции падает с увеличением чистоты пенициллина.

2. По интенсивности спектра абсорбции нельзя судить об антибактериальной активности пенициллина, так как инактивированный от действия кислот или щелочей пенициллин не изменяет спектра абсорбции и, наоборот, спектр абсорбции может измениться при обработке пенициллина амальгамой алюминия, без изменения активности пенициллина.

3. Конденсированные кольца молекулы, повидимому, частично или полностью насыщены и представляют собою многозамещенные гидроароматические кольца.

4. Возможно наличие в молекуле трехзамещенной ненасыщенной кето-группы.¹²



5. Карбоксильные группы не сопряжены с хромофором ($=C=O$).

Нотатин¹³

Антибактериальное вещество, выделенное из пенициллиум нота-тум Вестлингс, отличается от пенициллина как по свойствам, так и по методу получения. Первоначально нотатин был назван авторами пенициллином А, но ввиду отличия свойств он был переименован в нотатин.

Для получения нотатина чистую культуру пенициллиум нотатум Вестлингс выращивают на питательной среде Чапек-Докс'а. Для выделения нотатина из питательной среды ее после фильтрования упаривают в вакууме до $\frac{1}{5}$ объема, а затем полученный концентрат осаждают ацетоном или обрабатывают дубильной кислотой, которая с нотатином образует комплекс.

В последнем случае нотатин регенерируется из комплекса путем экстрагирования дубильной кислоты ацетоном и дальнейшей обработки комплекса солью Рейнеке.

Средний выход очищенного таким путем нотатина составляет 3—4 г на 100 л фильтрата питательной среды.

Нотатин, полученный таким путем, представляет собою рыжеватого цвета порошок, хорошо растворимый в воде, но почти нерастворимый в органических растворителях. Водный раствор нотатина имеет $\text{РН} = 6 - 7$. Активность нотатина теряется при РН ниже 2 и выше 8 или при нагреве до 60°C .

Нотатин разлагается 70%-ым водным метиловым спиртом при температуре 30° и водной трихлоруксусной кислотой, давая осадок протеинов и раствор, содержащий непротейную часть. Эти оба вещества, каждое в отдельности, обладают антибактериальными свойствами.

Элементарный анализ нотатина дал следующие результаты:

$$\begin{aligned} \text{C} &= 50\% \\ \text{H} &= 6,7\% \\ \text{N} &= 11,8\% \\ \text{P} &= 0,58\% \end{aligned}$$

Некоторые препараты нотатина содержат следы каталазы.

Нотатин дает положительную реакцию на протеины и реакцию с люминофлавином. На основе данных, полученных при изучении спектра поглощения водных растворов нотатина, его можно характеризовать как желтую энзиму; исходя из тех же данных, нотатин приближается к флавопротеину и, как таковой, обладает 90%-ой чистотой.

Применяя способ Варбурга и Христианса¹⁴, нотатин был подвергнут обработке трихлоруксусной кислотой и при этом была выделена, в виде раствора, непротениновая часть молекулы нотатина, которая, по данным спектрального анализа, приближается к рибофлавину (витамин В₂).

Серебряная соль, полученная из непротениновой части, нерастворима, и нотатин поэтому является, повидимому, динуклеотидом.

Нотатин проявляет антибактериальную активность только в определенных условиях, и в этих условиях он является весьма мощным бактериоцидом, а именно при:

- 1) наличии кислорода,
- 2) " глюкозы,
- 3) отсутствии заметных количеств каталазы.

Лучшие образцы препарата нотатина задерживают рост стафилококка 1:1 млрд.

Нотатин активен в очень больших разбавлениях по отношению ко многим грамположительным и грамотрицательным организмам: *Strept. haemolyticus*, *Strept. pneumoniae*, *B. typhosum*, *B. paratyphosum* A и B, *Bact. Typhi-murium*, *V. cholerae*, *B. anthracis* и *Proteus vulgaris*.

В присутствии нотатина глюкоза окисляется до глюконовой кислоты и перекиси водорода, и в этом отношении нотатин является более эффективным, чем оксидаза, полученная Мюллером¹⁵ из мицелия *Аспергиллус нигер*.

Исследований о действии нотатина *in vivo* пока нет, но предварительные данные указывают на терапевтическое действие его, в крайне малых дозах.

Повидимому, по своим свойствам близок к нотатину другой антибактериальный препарат—пенатин¹⁶, полученный Кохлати, который, однако, еще очень мало исследован.

К л а в и о ф о р м и н¹⁷

Новое антибактериальное вещество, образуемое в процессе роста грибов *Penicil. clavioform.*, названо клавиоформином. Клавиоформин—кристаллическое вещество, которое приостанавливает рост грамположительных и грамотрицательных организмов. Его действие, повидимому, бактерицидное. В концентрациях, которые можно было бы использовать для терапевтических целей, оно по отношению к животной клетке токсично и поэтому применение для этих целей, повидимому, маловероятно.

Т. пл. клавиоформина 110° (повторная кристаллизация из хлороформа); при 80—100° и высоком вакууме медленно сублимируется.

По элементарному составу для клавиоформина выведена брутто формула: C₉H₈O₅ (C=54,2%; H=31,8%). Содержит 1% S и 1% активного кислорода (Церевитинов-пиридин). Азота не содержит. Моле-

кулярный вес по Barger-Rast'y—182 (вычисл. 191). На молекулу клавиоформина приходится один атом активного водорода.

Оптически недеятелен.

Обладает сильной восстанавливающей способностью. На холоду восстанавливает аммиачный раствор серебра и раствор Фелинга. С 2, 4—динитрофенилгидразином в растворе 2/N H_2SO_4 дает желтый кристаллический осадок в течение 15 минут.

Хорошо растворим в воде, очень хорошо в спирте, ацетоне, умеренно в эфире, нерастворим в бензоле и петролейном эфире.

Антибактериальная активность не изменяется в кислой среде, даже при кипячении с N/10 HCl в течение 30 минут.

В щелочном растворе активность быстро исчезает; при $PH=10$ более 90% активности исчезает при 37° в течение 1 часа, а при $PH=9$ в тех же условиях исчезает 50% активности.

Клавиоформин с $PH=7$ теряет активность в течение 10 мин., при кипячении.

Биологические свойства пенициллина

Для определения биологических свойств *in vitro* предложен метод, выражающий активность пенициллина в оксфордских единицах.

Одна оксфордская единица соответствует количеству пенициллина, нужного для остановки роста стафилококков в разведении 1:50.000. Наиболее чистые препараты пенициллина содержат 450—500 оксфордских единиц на 1 мг препарата. Следует отметить, что не все стафилококки чувствительны к пенициллину *in vitro*. Согласно исследованиям Hobby, Meyer и Chaffe, два вида стафилококков оказались резистентными к пенициллину. Пенициллин *in vitro* не всегда стерилизует среду, зараженную микробами, но всегда наблюдается постоянное и значительное уменьшение количества микробов. Это подтверждается и нашими наблюдениями. В ряде случаев лабораторного исследования полученного нами пеницилларма последний едва заметно задерживал рост стафилококков, но в то же время обладал эффективными терапевтическими свойствами при лечении инфицированных стрепто-стафилококковых ран.

Количество пенициллина, необходимое для лечения инфицированных ран, выраженное в оксфордских единицах, колеблется в очень больших пределах.

По Флери¹⁸ местное лечение раны требует около 15 000 единиц пенициллина, а для лечения общего стафилококкового сепсиса необходимо около 1,5 млн. единиц пенициллина. По другим данным, при лечении гонорреи вводилось внутривенно от 80 до 100 тыс. единиц.

Сравнивая приведенные данные с нашим препаратом—пенициллармом, следует отметить, что при местном лечении инфицированных ран расход пеницилларма был, относительно, чрезвычайно мал.

Сопоставление данных иностранных клиник с нашими наблюде-

ниями показывает, что наш препарат—пеницилларм обладает большим терапевтическим эффектом, так как расходуется он при лечении в значительно меньшем количестве.

Florey H. W. и Jennings M. A.¹⁹ изучили некоторые биологические свойства высокоочищенного пенициллина. Было установлено, что совершенно чистые препараты пенициллина, очищенные по способу Абрагама и содержащие в одном миллиграмме 500 оксфордских пенициллиновых единиц, могут дать полную задержку роста стафилококков, в разведении 1:24 млн. и 1:30 млн. и частичную задержку роста 1:160 млн.

Все испытанные ими культуры стрептококков, резистентные в отношении к сульфамидным препаратам, оказались чувствительными к пенициллину.

Также оказались чувствительными к пенициллину и микробы из группы *Salmonella*.

Поскольку по мере очистки пенициллина возрастает его биологическая активность, возникло опасение, не возрастает ли одновременно токсичность пенициллина. Опыты на мышах показали, что при интравенозном введении мышам по 20 мг очищенного пенициллина в растворе 0,2 см³ воды (активность пенициллина 250—325 оксф. единиц в 1 мг) мыши не показали каких-либо отрицательных явлений, вызванных токсичностью препарата. Наоборот, применение в тех же дозах технического неочищенного пенициллина (активность пенициллина 40—50 единиц в 1 мг) вызвало у мышей болезненные явления, хотя и не смертельные. Отсюда вытекает, что более чистые препараты пенициллина менее токсичны.

Было также исследовано действие пенициллина на лейкоциты, причем было установлено, что по отношению к очищенному пенициллину лейкоциты более устойчивы.

На основании своих исследований Florey и Jennings пришли к выводу, что пенициллин является единственным препаратом, совмещающим мощную антибактериальную активность с отсутствием токсичности.

Клиническое испытание пенициллина

1. Применение пенициллина при гоноррейных инфекциях, не поддающихся лечению сульфамидами²⁰

Авторы экспериментально исследовали *in vitro* антибактериальное действие пенициллина против нескольких штаммов гонореи Нейсера, изолированных от больных, которые не поддавались соответствующему лечению сульфамидными препаратами.

Применяя пенициллин, удалось задержать рост указанных активных культур. Опыты показали, что количество организмов значительно уменьшается к концу одного или двух часов соприкосновения с пе-

пенициллином. Через 4 часа жизнеспособные организмы не были найдены.

После испытания *in vitro* пенициллин был применен для лечения пяти больных гонорреей, которые безрезультатно лечились сульфамидными препаратами и болели до начала лечения пенициллином от 1 до 11 месяцев.

Пенициллин вводился интравенозно, в сильном разбавлении с изотоническим раствором хлористого натрия. Каждому больному было введено от 68.000 до 104.000 оксфордских единиц пенициллина. Пенициллин был очищенный, содержал в 1 мг от 174 до 230 оксфордских единиц и не содержал пирогенных веществ, т. е. веществ, вызывающих повышение температуры.

Введение пенициллина не вызвало ни у одного больного неприятных ощущений, а клинические симптомы болезни очень быстро исчезли. Бактериологическое исследование выделений и мочи показало отсутствие гонореи Нейссера уже через 17—48 часов. Полное излечение больных протекало в течение 48—72 часов.

Авторы считают, что ввиду относительно малой доступности пенициллина, его нужно применять для лечения гонореи лишь в случаях, когда гонорея не поддается лечению сульфамидными препаратами.

2. Сравнительное клиническое испытание пенициллина и пропамидина при лечении ожогов²¹

Пенициллин в виде крема (1 г крема содержал 120 оксфордских единиц пенициллина) был применен в 54 случаях ожогов в различных стадиях заживления, с целью уничтожения гемолитического стрептококка. В 41 случае (76%) стрептококки исчезали в течение 5 суток и более не появлялись. В 7 случаях раны, на которые не оказывали действия сульфамидные препараты, заживали от применения пенициллина.

Также быстро исчезал из ран стафилококк. Заживление ран протекало быстро, и не было замечено токсических явлений.

Параллельно, для лечения ожогов в 34 случаях применялся крем, содержащий 0.1% пропамидина. Гемолитический стрептококк исчез в 21 случае (62%) через 5 суток, однако в восьми случаях гемолитический стрептококк не поддавался действию пропамидинового крема и существовал в ране во все время лечения. Из этих 8 случаев в 3-х случаях, при переходе на пенициллиновое лечение, гемолитический стрептококк быстро был уничтожен. Во многих случаях лечения пропамидиновым кремом заживление ран было очень хорошее, но протекало не так быстро, как при применении пенициллинового крема.

Получение пеницилларма*

Как известно, плесневые грибы сем. *Aspergillaceae* насчитывают более двухсот видов. Некоторые из них чрезвычайно распространены. Важнейшими представителями в этом семействе являются роды *Aspergillus* и *Penicillium*, каждый почти с сотней описанных видов. Роды *Aspergillus* и *Penicillium*, благодаря характерному построению, легко отличимы один от другого. В то время как конидиеносцы у *Penicillium*'а ветвисты, у *Aspergillus* конидиеносцы не ветвятся, а на своей вершине имеют вздутие.

Отдельные виды указанных родов имеют ряд самостоятельных, весьма трудно различимых подвидов. Многие из них имеют практическое значение. Одни из них являются вредителями плодов, как, например, *Penicil. italicum* и *Pen. digitatum*, являющиеся вредителями цитрусовых, или *Pen. expansum* и *Pen. crustaceum*, являющиеся вредителями яблок.

Некоторые виды *Aspergillus* применяются при осахаривании риса (*Asp. oryzae*), при лимонно-кислое брожении (*Asp. citromyces*), в сыроварении (*Pen. roqueforti*, *Pen. camemberti*).

Однако, не все виды грибов при их размножении способны продуцировать антибактериальные вещества. При изучении ряда видов пенициллиумов и аспергиллусов мы установили такую способность лишь для немногих и выбрали для нашей работы по приготовлению пеницилларма выделенную нами чистую культуру штамма *Penicillium*.

В отличие от способа Абрагама, средой для выращивания нашего штамма является агар—виноградное сусло.

При работе в больших масштабах размножение ведется на питательной среде—виноградное сусло плюс вода, содержание сахара 18—20%, pH 5,6—6,4, кислотность не выше 1,0—1,5.

Все условия роста весьма близки к условиям, описанным выше для способа Абрагама.

В отличие от способа Абрагама мы выделяем антибактериальное вещество не только из питательной среды, но и из грибницы. Наши исследования показали, что в самой грибнице содержится значительное количество весьма эффективного антибактериального средства.

Выделенный в виде водного раствора антибактериальный препарат пеницилларм подвергается очистке путем многократного экстрагирования из первоначального водного раствора (будем называть сырого пенициллина) эфиром или этилацетатом и последующего выще-

*В конце марта 1943 г. в лаборатории органической химии Ереванского государственного университета были начаты работы по изучению возможных путей получения пенициллина. Работа поставлена акад. Исагулянцем В. И. при участии микробиолога А. Абрамян, химиков Вязковой М. А., Исагулянц Г. В., Абовян Х.

Первое сообщение о получении и испытании пеницилларма было сделано 30/VII 1943 г. в г. Ереване, на открытом заседании ученого совета химического факультета Ереванского гос. университета.

лачивания из органических растворителей пеницилларма водой, подщелоченной бикарбонатом, до РН 6,4—6,8.

В настоящее время пеницилларм производится в лабораторном масштабе в лаб. органической химии Ереванского гос. университета в количествах примерно 10—15 л водного раствора, активность которого колеблется в пределах 25—50 оксфордских единиц на 1 мг.

Первые образцы пеницилларма были получены нами в мае 1943 г., которые и были изучены на бактериостатичность и бактерицидность сначала в лабораторных условиях *in vitro*, а затем *in vivo* на белых мышах и кроликах в Государственном институте микробиологии и эпидемиологии, проф. Алексанян А. Б.

В результате этих исследований было установлено:

1. Пеницилларм совершенно безвреден для макроорганизма (*per os*, внутримышечно и внутривенно; испытания на мышах и кроликах).

2. Пеницилларм задерживает рост стафилококка *in vitro*.

3. Пеницилларм, введенный кроликам, зараженным стафилококковой инфекцией (искусственное заражение путем введения в вену кролика стафилококка), обрывает у кролика заболевание, и через 24—36 часов кролик практически здоров.

Первое клиническое испытание пеницилларма было сделано в кожно-венерической клинике Ереванского госуд. мед. института зав. кафедрой проф. Худадовым Д. С.

Водные растворы пеницилларма были испытаны на многих больных в различных модификациях, при ряде кожных и венерических заболеваний.

Клинические наблюдения показали особую эффективность применения раствора пеницилларма при поверхностных и глубоких гнойничковых заболеваниях кожи (пиодермии, фолликулитах, фурункулах и пр.), а также при трихомонадных заболеваниях мочеполовой среды.

Наблюдения проводились в клинике в течение пяти месяцев и привели к следующим выводам:

1) заживление поверхностных гнойничковых заболеваний кожи длится в среднем 2—3 дня, глубоких 4—5 дней, что является большим достижением в этой области, сокращая лечение в 2—3 раза;

2) раствор пеницилларма при наружном применении совершенно не раздражает кожу и слизистую оболочку;

3) методика лечения раствором пеницилларма весьма простая и опрятная;

4) эффективность лечения пенициллармом трихомонадных заболеваний мочеполовой сферы позволяет предполагать возможность широкого применения его при целом ряде других протозойных заболеваний.

Для иллюстрации приводим несколько примеров:

Больной Г. И., 42 лет, полковник, жалуется на гнойное высыпание в области волосистой части шеи, наблюдаемое в течение 2-х ме-

сяцев. Лечился амбулаторно ихтиоловой мазью и раствором риванола. Наблюдалось улучшение, но болезнь вновь рецидивировала.

Диагноз: Сикоз волосистой части шеи. Очаг поражения величиной в детскую ладонь.

Лечение пенициллармом начато 24/VII. В течение 5 дней ежедневно на очаг поражения накладывалась влажная пенициллиновая повязка. После третьей повязки гнойнички очистились. Отделяемое серозного характера.

Лечение пенициллармом закончено 31/I.

4/II. Больной клинически здоров.

25/II. Здоров. Рецидива не наблюдалось.

Больная В. К., 28 лет, страдает пенным выделением из влагалища в течение 5 лет.

Анализ выделения: гонококки Нейссера не обнаружены. Большое количество лейкоцитов. Найдены трихомоназ вагиналис.

Диагноз: Трихомонадный вагинит.

Лечение пенициллармом начато 25/XII. Во влагалище промыто теплой водой. Вложен ватный тампон, смоченный раствором пеницилларма.

26/XII. Незначительное выделение слизистого характера. Анализ выделения: лейкоциты в незначительном количестве. Трихомоназ вагиналис не найдены.

27/XII. Мензес.

2/I. Анализ слизи: лейкоцитов 5—6 в поле зрения. Трихомоназ вагиналис не обнаружен. Клинически здорова.

2/II. Клинически здорова.

2/III. Рецидива не наблюдается. Здорова.

Пеницилларм подвергся клиническому испытанию в факультетской хирургической клинике (Ереванского медицинского института) проф. Еоляна Р. О. для лечения ряда хирургических инфекций (стафилококк и стрептококк). В ряде случаев (описанных ниже) крайне тяжелые заболевания, длившиеся месяцами, были излечены в несколько дней.

Пеницилларм применялся, главным образом, наружно (примочки, тампоны, турунды).

Для иллюстрации приводятся выписки из истории болезни.

1. Больной З. Р. поступил в факультетскую хирургическую клинику с жалобой на сильные боли в области копчика и нижней половины крестцовой области. В области копчика 5 месяцев тому назад появились свищи с большими гнойными выделениями. Несмотря на лечение, свищи не имеют тенденции к закрытию. В области свищей появилась болезненная припухлость размером 6×8 см. Температура $38-39^{\circ}$.

В гное из полости абсцесса при бактериологическом исследовании обнаружен стафилококк.

Лечение пенициллином начато 22/XI. Из полости абсцесса откачано шприцем около 5 см³ и введено столько же пеницилларма.

24/XI. Припухлость сильно уменьшилась, болей значительно меньше. Из полости абсцесса откачано около 2 см³ оранжевой жидкости, которая при бактериологическом исследовании оказалась стерильной.

28/XI. Припухлости нет (инфильтрат рассосался), свищи закрылись, болей совершенно нет. Больной чувствует себя совершенно здоровым.

29/XI. Выписался здоровым.

2. Больная О. Г., 64 лет, страдает хронической язвой левой голени более 6 месяцев. Лечилась в хирургическом стационаре и поликлинике кварцем и др. методами, безрезультатно. Лечение пенициллармом начато 3/I. При бактериологическом исследовании гноя, взятого с поверхности язвы, найден золотистый стафилококк. На поверхность язвы наложена влажная повязка, смоченная пенициллармом; сверху сухая асептическая повязка.

6/I. Язва сильно уменьшилась, очистилась, воспалительные явления в окружности почти исчезли. Больная отмечает сильное облегчение.

9/I. Язва покрылась небольшой сухой корочкой. Считая больную выздоровевшей, лечение закончено.

3. Больной Г. А., 40 лет, поступил в клинику с жалобами на незаживающую язву и боли в левой стопе. Болен 8 месяцев. После ушиба появилась рана, которая, несмотря на систематическое лечение, не зажила, а превратилась в язву. В гнойных выделениях язвы, при бактериологическом исследовании, обнаружены стрепто-стафилококки. Лечение пенициллармом начато 7/I. На язву наложены смоченные пенициллармом влажные повязки.

10/I. Больной отмечает большое облегчение, отсутствие болей. Язвы хорошо очистились, покрылись сочными грануляциями; началась краевая эпителизация. Наложена новая повязка с пенициллармом.

13/I. Язвы сильно уменьшились в размерах, выделений почти нет. Самочувствие очень хорошее. Наложена повязка с пенициллармом.

17/I. Язвы совершенно закрылись, больной выписался здоровым.

Факультетская хирургическая клиника продолжает свои исследования по лечению пенициллармом хирургических инфекций и инфицированных ран.

В последнее время пеницилларм испытывается в глазной клинике (воспаление слезных мешков, воспалительный процесс был приостановлен без хирургического вмешательства), отоларингологической клинике проф. Арутюняна А. А., где уже получены ободряющие результаты.

Пеницилларм по своим свойствам приближается к пенициллину Абрагама. Предварительные наблюдения показали, что он в водных растворах (РН 5,8—6,6) довольно хорошо сохраняется, не теряя

своей активности в течение нескольких месяцев. Он отличается от пенициллина английского и американского тем, что для лечения ран пеницилларма требуется значительно меньше (в оксф. единицах) по сравнению с американскими данными.

В настоящей работе освещен вопрос о значении, получении, свойствах и применении нового антибактериального препарата пенициллина заграницей и сообщаются предварительные данные о получении и применении аналогичного по свойствам нашего отечественного препарата, названного „пенициллармом“.

Полученный в лаборатории органической химии Ереванского гос. университета пеницилларм к 1 марта 1944 г. прошел клиническое испытание на более чем 50 больных и показал прекрасный терапевтический эффект.

В настоящее время продолжается работа по выделению более чистых образцов пеницилларма для применения в более ответственных случаях, а также накопления его в целях дальнейшего, более глубокого химического исследования.

Пользуюсь случаем принести благодарность проф. Н. Н. Протосердову и доктору наук А. Л. Тахтаджян за полученные полезные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fleming A.* Britisch Journal of Experimental Pathology, **10**, 226—236 (1929).
2. *Dubos R.* Journ. Experim. Medicine, **70**, 1. (1939).
3. *Abraham E. P., Chain E.* и др. The Lancet, **2**, 7, 177—188 (1941).
4. *Richards A. N.* The Journ. Am. Medic. Assoc. **122**, № 4, 235—36 (1943).
5. *Abraham E. P., Chain E.* и др. The Lancet, **2**, 7, 177—188.
6. *Abraham E. P., Chain* и др. Journ. of Experiment. Pathology, **23**, № 3, 103—115 (1943).
7. *Freed M., Wynne A. M.* Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) **8**, 278, (1936).
8. *Müller B. F., van Slyke D. D.* Journ. Biol. Chem. **114**, 583 (1936).
9. *Meyer K.* Hobby, Science, **37**, 205 (1943).
10. *Abraham E., Chain E., Baker W., Robinson R.* Nature, **151**, 107 (1943).
11. *Holiday E. R.* The Brit. Journ. of Experiment. Pathology. **23**, № 3, 115—119.
12. *Evans L. K., Gillam A. E. J.* Chem. Soc. 815 (1941).
13. *Woodward K. B.* Journ. Am. Chem. Soc. **63**, 1123 (1941).
14. *Culthard C. E., Schort W. F., Michaelis R., Sykes, G.*—Nature, **150**, № 3813-634—35 (1942).
15. *Warburg,* Christians Biochem. Z. **298**, 150 (1938).
16. *Müller, Liebigs Annalen*, **532**, 1 (1937), **541**, 117 (1936).
17. *Kocholaty, J.* Bact., **44**, 142 (1942).
18. *Chain E., Florey, Jennings.* The Brit. Journ. of Experim. Pathology, **23**, 4, 202—205 (1942).
19. *Florey,* март 1943, стр. 387.
20. *Florey, Jennings,* Brit. Journ. Experim. Pathology, **23**, 3, 120—123 (1942).
21. *Herrel W. E., Edward N. Cook, Luther Thompson.*
22. *Clark A. M., Gibson T., Colebrock Z., Thompson M. L.* The Lancet, № 6, 246, 605—609 (1943).

Ա. Կադեմիկոս Վ. Ի. Իսագուլյանց

ՊԵՆԻՑԻԼԻՆ—ՆՈՐ ՀԱԿԱԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ՊՐԵՊԱՐԱՏ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ի Մ

Սույն աշխատության մեջ նկարագրված են նոր հակաբակտերիալ պրեպարատ պենիցիլինի նշանակությունը, ստացումը, հատկությունները և կիրառումն առատասանմանում և հազորդված են նախնական ավյալներ մեր հայրենի պրեպարատի՝ «պենիցիլարմի» ստացման և կիրառման մասին: Պենիցիլարմին իր հատկություններով նման է պենիցիլինին:

Նրանի պետական համալսարանի օրգանական քիմիայի լաբորատորիայում ստացված պենիցիլարմը առ 1944 թ. մարտի մեկը ենթարկվեց կլինիկական քննարկման ավելի քան 50 հիվանդների վրա և ավելի թերապևտիկ հիանալի արդյունք:

Ներկայումս շարունակվում է պենիցիլարմի ավելի մաքուր նմուշներ ստանալու աշխատանքը՝ ավելի պատասխանատու դեպքերում օգտագործելու, ինչպես նաև նրա հետագա քիմիական ավելի խոր հետազոտություն համար:

V. I. Issaguliantz

Penicillin—new anti-bacterial preparation

S u m m a r y

In the present paper a question is elucidated on the significance, production, nature and use of a new anti-bacterial preparation—penicillin, abroad, and preliminary data are supplied on the production and use of our home-made preparation termed „penicillarm“, which, in its properties, is analogous to penicillin.

Penicillarm obtained in the Laboratory of organic chemistry of the Erevan state University by the first of March 1944 has been clinically tested over more than 50 patients and has shown an excellent therapeutic effect.

At present we are engaged in the work to secure more pure samples of penicillarm for the purposes of its application in more responsible cases and its accumulation for further closer chemical study of the latter.