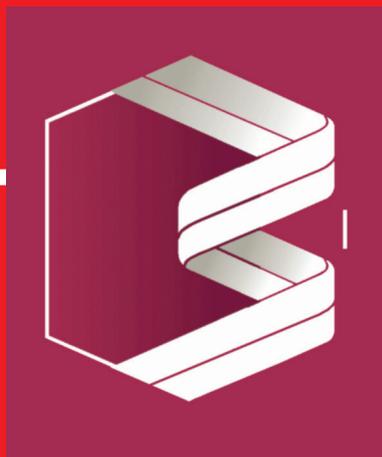


ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 69



11-12'2024

Научно-практический журнал

Учредители:

ISSN 0235-2990

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

Нагатинская ул., д. За, Москва, 117105.
Тел.: 89254723038
E-mail: journalgnca@yandex.ru
Зав. редакцией к. б. н. Л. Б. Смирнова
Корректор: Е. А. Крыкова
Перевод: О. С. Смирнова
Сайт: www.antibiotics-chemotherapy.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 89254723038
E-mail: gncajournal@yandex.ru
Л. И. Гусак

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка через объединённый
каталог «Пресса России»
или через «Агентство «КнигаСервис»:
подписной индекс — E71404

Журнал зарегистрирован
в Комитете РФ по печати
Рег. свид. № 0110694 от 25 мая 1993 г.

Установочный тираж 5000 экз.

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: декабрь 2024

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 69

11–12'2024

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор

Чл. корр. РАН, профессор, д. м. н. Сидоренко С. В.

Зам. главного редактора
профессор, д. м. н. Яковлев С. В.

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Профессор, д. м. н. Белобородов В. Б.
Академик РАН, профессор, д. б. н. Говорун В. М.
Чл. корр. РАН, профессор, д. б. н. Ильина Е. Н.
Профессор, д. м. н. Колбин А. С.
Профессор, д. м. н. Кочеровец В. И.
Академик РАН, профессор, д. м. н. Лобзин Ю. В.
Профессор, д. х. н. Олсуфьева Е. Н.
Д. б. н. Переверзева Э. Р.
Д. м. н. Припутневич Т. В.
Профессор, д. м. н. Руднов В. А.
Д. б. н. Садыкова В. С.
Академик РАН, профессор, д. м. н. Сычев Д. А.
Д. х. н. Тевяшова А. Н.
Профессор, д. х. н. Тишков В. Н.
Чл. корр. РАН, профессор, д. б. н. Тутельян А. В.
Профессор, д. м. н. Шляпников С. А.
Профессор РАН, д. х. н. Щекотихин А. Е.

Научные редакторы

К. м. н. Кузнецова С. М.
К. б. н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Богуш Т. А.	Клясова Г. А.
Васильев А. Н.	Ленёва И. А.
Волжанин В. М.	Митрохин С. Д.
Дмитриева Н. В.	Тец В. В.
Захарова Ю. А.	Ших Е. В.
Зуева Л. П.	

Founders:

ISSN 0235-2990

**Ministry of Health
of the Russian Federation**

State Scientific Center for Antibiotics

«Antibiotiki i Khimioterapiya»
(«Antibiotics and Chemotherapy»)
**Monthly Scientific
and Practical Journal**

Founded in 1956

Editorial office address:

3a Nagatinskaya st., Moscow, 117105
Russia
Tel.: +7-925-472-30-38
E-mail: journalgnca@yandex.ru
Head of the Editorial Office:
Ph. D. in Biology Lyudmila B. Smirnova
Proofreader: Ekaterina A. Krykova
Translator: Olga S. Smirnova
Website:
www.antibiotics-chemotherapy.ru

Advertising Department:

Tel.: 89254723038
E-mail: gncajournal@yandex.ru
Larisa I. Gusak

Publisher:

Izdatelstvo «OKI»



*Subscription through the united
catalogue «Pressa Rossii»
(«Russian Press») or through
«Agentstvo Kniga-Servis»
(«Book Service Agency»):
subscription index — E71404*

The journal is registered
with the Press Committee
of the Russian Federation
Registration certificate No. 0110694
dated May 25, 1993

Circulation: 5000 copies

Tipography:
OOO «Litera»

Release Date: December 2024
Free price

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Volume 69

11–12'2024

MONTHLY JOURNAL

Editor-in-Chief

**Corresponding member of the RAS,
Professor, D. Sc. in Medicine Sergey V. Sidorenko
Deputy Editor-in-chief
Professor, D. Sc. in Medicine Sergey V. Yakovlev**

**RESPONSIBLE FOR THE ISSUE
Dmitry Yu. Belousov**

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Professor, D. Sc. in Medicine Vladimir B. Beloborodov
Academician of the RAS, Professor,
D. Sc. in Biology Vadim M. Govorun
Professor, D. Sc. in Biology Elena N. Ilyina
Professor, D. Sc. in Medicine Alexey S. Kolbin
Professor, D. Sc. in Medicine Vladimir I. Kocherovets
Academician of the RAS, Professor,
D. Sc. in Medicine Yuriy Yu. Lobzin
Professor, D. Sc. in Chemistry Evgenia N. Olsufieva
D. Sc. in Biology Eleonora R. Pereverzeva
D. Sc. in Medicine Tatyana V. Priputnevich
Professor, D. Sc. in Medicine Vladimir A. Rudnov
D. Sc. in Biology Vera S. Sadykova
Academician of the RAS, Professor,
D. Sc. in Medicine Dmitry A. Sychev
D. Sc. in Chemistry Anna N. Tevyasheva
Professor, D. Sc. in Chemistry Vladimir N. Tishkov
Corresponding member of the RAS, Professor,
D. Sc. in Medicine Alexey V. Tutelyan
Professor, D. Sc. in Medicine Sergey A. Shlyapnikov
Professor, D. Sc. in Chemistry Andrey E. Shchekotikhin

Scientific Editors

Ph. D. in Medicine Svetlana M. Kuznetsova
Ph. D. in Biology Irina V. Belyavskaya

EDITORIAL COUNCIL

Tatyana A. Bogush	Galina A. Klyasova
Andrey N. Vasiliev	Irina A. Leneva
Valeriy M. Volzhanin	Sergey D. Mitrokhin
Natalya V. Dmitrieva	Victor V. Tets
Yuliya A. Zakharova	Evgenia V. Shikh
Lyudmila P. Zueva	

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

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

Экспериментальные исследования

Experimental Research

- Смолина Т. П., Крьюлова Н. В., Кузнецова Т. А., Иванушко Л. А., Гажа А. К., Персиянова Е. В., Майстровская О. С., Гапека А. В., Белов Ю. А., Кокоулин М. С., Шелканов М. Ю.
Анти-SARS-CoV-2 и иммуномодулирующая активность полисахаридов морских бактерий
- Григорьева Т. А., Пожарский А. А., Григорьев Я. А., Киндт Д. Н., Новикова Д. С.
Оптимизация схемы деконтаминации перевиваемых культур клеток человека антибиотиками различного механизма действия
- Клабуков А. М., Разгуляева Д. Н., Нестерова Н. А., Тищенко Ю. А., Ахметова Д. Р., Гаврилова Н. В., Шпиловских С. А., Штро А. А., Панарин Е. Ф.
Оценка противовирусной активности полимерных лектролитов, инкапсулированных в микронный кальций карбонат, в отношении респираторно-синцитиального вируса
- Струкцова Е. Н., Голикова М. В., Кобрин М. Б., Довженко С. А., Голышкин А. В., Алышева Н. Р., Портной Ю. А.
Эффективность комбинации меропенем/авибактам при действии на карбапенемазопродуцирующие штаммы *Klebsiella pneumoniae* в динамической системе *in vitro*
- Матичин А. А., Мирошников М. В., Матичина А. А., Косман В. М., Карлина М. В., Петрова Е. М., Глобенко А. А., Джайн Е. А., Капашин А. В., Владыкин А. Л., Колосов А. С., Пасько М. А.
Изучение безопасности и токсикокинетических параметров лекарственного препарата Эладис® в доклинических исследованиях с многократным введением
- Логонова С. Я., Шукина В. Н., Савенко С. В., Рубцов В. В., Кутаев Д. А., Борисевич С. В., Ковтун В. А., Мосин Н. И., Мурадов М. М., Волков В. Л., Беляев А. С., Предтеченский А. Б.
Противовирусная активность препарата 5-хлорпиридин-3-ил-1H-индол-4-карбоксилат (AMND) в отношении возбудителя COVID-19

Клинические исследования и практика

Clinical Research and Practice

- Асланов Б. И., Гончаров А. Е., Конев С. Д., Мохов А. С., Азаров Д. В., Лебедева Е. А., Кулешова А. В., Колоджиева В. В., Колосовская Е. Н., Нифонтова А. М., Лиознов Д. А.
Чувствительность штаммов *Klebsiella pneumoniae* выделенных от больных COVID-19, к коммерчески доступным препаратам бактериофагов
- Отамуратова Н. Х., Абдухалилова Г. К., Ахмедова Д. Р., Турсунова Ю. А.
Эпидемиологические особенности мониторинга чувствительности штаммов *Staphylococcus aureus*
- 5 Smolina Tatyana P, Krylova Natalia V, Kuznetsova Tatyana A, Ivanushko Ludmila A, Gazha Anna K, Persiyanova Elena V, Maistrovskaya Olga S, Gapeka Alena V, Belov Iurii A, Kokoulin Maksim S, Shchelkanov Mikhail Yu.
Anti-SARS-CoV-2 and Immunomodulatory Activity of Marine Bacteria Polysaccharides
- 16 Grigoreva Tatyana A, Pozharskii Artur A, Grigorev Yaroslav A, Kindt Daria N, Novikova Daria S.
Optimization of the Scheme for Decontaminating Continuous Human Cell Cultures with Antibiotics of Different Mechanisms
- 25 Klabukov Artem M, Razgulyaeva Darya N, Nesterova Natalya A, Tishchenko Yuliya A, Akhmetova Darya R, Gaurilova Nina V, Shipilovskikh Sergei A, Shtro Anna A, Panarin Evgeniy F.
Evaluation of Antiviral Activity of Polymer Electrolytes Encapsulated in Micon Calcium Carbonate Against Respiratory Syncytial Virus
- 32 Strukova Elena N, Golikova Maria V, Kobrin Mikhail B, Dovzhenko Svetlana A, Golyshkin Alexandr V, Almyasheva Nailya R, Portnoy Yury A.
The Effectiveness of the Combined Use of Meropenem and Avibactam Against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in an *in vitro* Dynamic Model
- 41 Matichin Aleksandr A, Miroshnikov Mihail V, Matichina Alena A, Kosman Vera M, Karlina Marina V, Petrova Elizaveta M, Globenko Alexander A, Jain Ekaterina A, Kapashin Aleksey V, Vladyskin Alexander L, Kolosov Andrey S, Pasko Maksim A.
Study of the Safety and Toxicokinetic Parameters of the Drug Eladis® in Preclinical Trials with Repeated Administration
- 49 Loginova Svetlana Ya, Shchukina Veronika N, Savenko Sergey V, Rubtsov Vladimir V, Kutayev Dmitry A, Borisevich Sergey V, Kovtun Viktor A, Mosin Nikita I, Muradov Mikhail M, Volkov Vitaly L, Belyaev Artur S, Predtechensky Alexander B.
Antiviral Activity of 5-chloropyridin-3-yl-1H-indole-4-carboxylate (AMND) Against COVID-19
- 59 Aslanov Batyrbek I, Goncharov Artemiy E, Konev Sergei D, Mochov Alexey S, Azarov Danil V, Lebedeva Ekaterina A, Kuleshova Alyona V, Kolodzhieva Viktoria V, Kolosovskaya Elena N, Nifontova Anna M, Lioznov Dmitry A.
The Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from COVID-19 Patients to Commercially Available Bacteriophage Medications
- 67 Otamuratova Nargiza Kh, Abdukhalilova Gulnora K, Akhmedova Dilshoda R, Tursunova Yu. A.
Epidemiological Aspects of Monitoring the Sensitivity of *Staphylococcus aureus* Strains

* 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 и кандидата наук.

<p style="text-align: center;"><i>Варганов М. В.</i></p> <p>Опыт применения NPWT-терапии и субстратного антигипоксанта в лечении полиморбидного пожилого возраста (клиническое наблюдение)</p>	<p>75</p>	<p><i>Varganov Mikhail V.</i></p> <p>The Use of Negative Pressure Wound Therapy and Substrate Antihypoxant in the Treatment of an Elderly Polymorbid Patient (Clinical Observation)</p>
<p style="text-align: center;"><i>Арамисова Р. М., Хоконова Л. Т., Камбачокова З. А., Таукенова Л. М., Шогенова А. Р., Гогаева Д. С., Дадарова Э. Х., Теммоева К. Х., Холаева А. Ж., Хацукова Л. З., Хагиева И. М.</i></p> <p>Клинико-эпидемиологические особенности течения и лечения мочекаменной болезни среди населения Кабардино-Балкарской республики</p>	<p>80</p>	<p><i>Aramisova Rina M., Khokonova Liana T., Kambachokova Zareta A., Taukenova Leila M., Shogenova Alina R., Gogaeva Dana S., Dadarova Elina Kh., Temmoeva Kamila Kh., Kholaeva Anzhelina Zh., Khatsukova Liana Z., Khagieva Iman M.</i></p> <p>Clinical and Epidemiological Aspects of The Course of Urolithiasis and Its Treatment Among the Population of the Kabardino-Balkarian Republic</p>
Обзоры		
<p style="text-align: center;"><i>Даудова А. Д., Демина Ю. З., Рубальский О. В., Ясенявская А. Л.</i></p> <p>Биоплёнки и методы их воспроизведения в эксперименте</p>	<p>85</p>	<p><i>Daudova Adilya D., Demina Yuliya Z., Rubalsky Oleg V., Yasenyavskaya Anna L.</i></p> <p>Biofilms and Methods of Their Reproduction in the Experiment</p>
<p style="text-align: center;"><i>Баранцевич Н. Е., Иванова Л. В., Баранцевич Е. П.</i></p> <p><i>Acinetobacter baumannii</i>: механизмы антимикробной резистентности</p>	<p>93</p>	<p><i>Barantsevich Natalia E., Ivanova Larisa V., Barantsevich Elena P.</i></p> <p><i>Acinetobacter baumannii</i>: Mechanisms of Antimicrobial Resistance</p>
<p style="text-align: center;"><i>Чумак А. В., Синёва О. Н.</i></p> <p>Биоразнообразие и антимикробный потенциал ацидофильных и ацидотолерантных актиномицетов</p>	<p>101</p>	<p><i>Chumak Anastasia V., Sineva Olga N.</i></p> <p>Biodiversity and Antimicrobial Potential of Acidophilic and Acidotolerant Actinomycetes</p>
<p style="text-align: center;"><i>Автономова А. В., Краснопольская Л. М.</i></p> <p>Анализ структуры возбудителей инвазивных микозов и развития их устойчивости к противогрибковым препаратам</p>	<p>110</p>	<p><i>Autonomova Anastasia V., Krasnopolskaya Larisa M.</i></p> <p>Structure of Pathogens Causing Invasive Mycoses and the Development of Their Resistance to Antifungal Drugs</p>
<p style="text-align: center;"><i>Грацианская А. Н., Теплова Н. В., Белоусова Л. Б.</i></p> <p>Новые возможности преодоления антибиотикорезистентности бактерий</p>	<p>121</p>	<p><i>Gratsianskaya Anna N., Teplova Natalia V., Belousova Ludmila B.</i></p> <p>New Possibilities for Overcoming Antibiotic Resistance in Bacteria</p>
<p style="text-align: center;"><i>Баранова М. М., Муравьева Н. В., Белов Б. С.</i></p> <p>Коморбидные инфекции при спондилоартритах: современное состояние проблемы</p>	<p>127</p>	<p><i>Baranova Marina M., Muravyeva Natalia V., Belov Boris S.</i></p> <p>Comorbid Infections in Spondyloarthritis: the Current State of the Problem</p>

* 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 и кандидата наук.

Анти-SARS-CoV-2 и иммуномодулирующая активность полисахаридов морских бактерий

Т. П. СМОЛИНА¹, Н. В. КРЫЛОВА¹, *Т. А. КУЗНЕЦОВА¹, Л. А. ИВАНУШКО¹,
А. К. ГАЖА¹, Е. В. ПЕРСИЯНОВА¹, О. С. МАЙСТРОВСКАЯ¹, А. В. ГАПЕКА¹,
Ю. А. БЕЛОВ¹, М. С. КОКОУЛИН², М. Ю. ЩЕЛКАНОВ^{1,3}

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

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

³ Дальневосточный федеральный университет, Школа медицины и наук о жизни, Владивосток, Россия

Резюме

Введение. В настоящее время проводятся интенсивные исследования по поиску новых препаратов для лечения COVID-19, включая изыскание альтернативных противовирусных методов лечения. Полисахариды морских бактерий (ПС) представляют собой безопасные, биоразлагаемые и биосовместимые полимеры с широким спектром биологической активности, в числе которой способность оказывать противовирусные и иммуномодулирующие эффекты. В связи с этим ПС привлекают пристальное внимание учёных как перспективный источник противовирусных лекарственных субстанций. **Цель** — оценка влияния ПС из 3 разных видов морских бактерий на экспрессию поверхностных маркеров активации клеток врождённого иммунитета и изучение противовирусной активности этих ПС в отношении вируса SARS-CoV-2. **Материал и методы.** Влияние ПС на экспрессию поверхностных маркеров активации клеток врождённого иммунитета исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Изучение анти-SARS-CoV-2 активности ПС в отношении ранней стадии жизненного цикла вируса изучали методом ингибирования цитопатогенного действия вируса (в МТТ-тесте) и методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ). **Результаты.** Установлено, что исследуемые ПС из морских бактерий, различающиеся по химической структуре, в условиях *in vitro* активируют клетки врождённого иммунитета (моноциты, нейтрофилы, НК-клетки). Результаты, полученные как в тесте ингибирования цитопатогенного действия вируса, так и по снижению уровня РНК вируса SARS-CoV-2 продемонстрировали анти-SARS-CoV-2 активность исследуемых ПС. Наибольшую активность проявил ПС1, эффективно ингибируя ранние стадии взаимодействия SARS-CoV-2 с клеткой. **Заключение.** Исследуемые ПС можно считать перспективным источником противовирусных лекарственных субстанций.

Ключевые слова: полисахариды морских бактерий; иммуномодулятор; клетки врождённого иммунитета; нейтрофилы; моноциты; НК-клетки; анти-SARS-CoV-2 активность

Для цитирования: Смолина Т. П., Крылова Н. В., Кузнецова Т. А., Иванушко Л. А., Гажа А. К., Персиянова Е. В., Майстровская О. С., Гапека А. В., Белов Ю. А., Кокоулин М. С., Щелканов М. Ю. Анти-SARS-CoV-2 и иммуномодулирующая активность полисахаридов морских бактерий. *Антибиотики и химиотерапия*. 2024; 69 (11–12): 5–15. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-5-15>. EDN: TXWPUH.

Anti-SARS-CoV-2 and Immunomodulatory Activity of Marine Bacteria Polysaccharides

TATYANA P. SMOLINA¹, NATALIA V. KRYLOVA¹, *TATYANA A. KUZNETSOVA¹,
LUDMILA A. IVANUSHKO¹, ANNA K. GAZHA¹, ELENA V. PERSIYANOVA¹,
OLGA S. MAISTROVSKAYA¹, ALENA V. GAPEKA¹, IURII A. BELOV¹,
MAKSIM S. KOKOULIN², MIKHAIL YU. SHCHELKANOV^{1,3}

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

² G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Science, Vladivostok, Russia

³ Far Eastern Federal University, School of Medicine and Life Sciences, Vladivostok, Russia

Abstract

Background. Intensive research is currently underway to find new drugs to treat COVID-19, including the search for alternative antiviral treatments. Marine bacteria polysaccharides (PSs) are safe, biodegradable, and biocompatible polymers with a wide range of biological activity, including the ability to exert antiviral and immunomodulatory effects. In this regard,

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: takuznets@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: takuznets@mail.ru

EDN: TXWPUH



PSs attract the close attention of scientists as a promising source of antiviral medicinal substances. *The aim of the work is to evaluate the effect of PSs from 3 different species of marine bacteria on the expression of surface activation markers of innate immunity cells and to study their antiviral activity against the SARS-CoV-2 virus. Methods.* The effect of PSs on the expression of surface activation markers of innate immunity cells was studied by flow cytometry. The study of the anti-SARS-CoV-2 activity of the PSs at the early stages of the virus life cycle was evaluated by inhibiting the cytopathogenic effect of the virus (in the MTT assay) and by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR-RV). *Results.* It was found that the studied PSs, differing in chemical structure, induced activation of innate immunity cells (monocytes, neutrophils, NK cells) *in vitro*. The results obtained both in the test of inhibition of the cytopathogenic effect of the virus and in reducing the level of RNA of the SARS-CoV-2 virus demonstrated the anti-SARS-CoV-2 activity of the PSs. PS1 showed the greatest activity, effectively inhibiting the early stages of SARS-CoV-2 interaction with the cell. *Conclusion.* The studied PSs can be considered a promising source of antiviral medicinal substances.

Keywords: polysaccharides of marine bacteria, immunomodulators, innate immune cells, neutrophils, monocytes, NK cells, anti-SARS-CoV-2 activity

For citation: Smolina T. P., Krylova N. V., Kuznetsova T. A., Ivanushko L. A., Gazha A. K., Persiyanova E. V., Maistrovskaya O. S., Gapeka A. V., Belov Iu. A., Kokoulin M. S., Shchelkanov M. Yu. Anti-SARS-CoV-2 and immunomodulatory activity of marine bacteria polysaccharides. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 5–15. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-5-15>. EDN: TXWPUH. (in Russian)

Введение

Коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2-го типа (SARS-CoV-2 - severe acute respiratory coronavirus 2) (Nidovirales: *Coronaviridae*, *Betacoronavirus*) является этиологическим агентом смертельно опасного для человека коронавирусного заболевания (COVID-19 — coronavirus disease 2019) [1, 2]. Долгое время коронавирусы рассматривались как ветеринарная проблема [3]; лишь в начале XXI века стал очевиден значительный эпидемический потенциал этих вирусов [4–7]; а разразившаяся в 2020–2023 гг. пандемия COVID-19 [7–10] подтвердила предположения отечественных специалистов о существовании у коронавирусов пандемического потенциала [3, 10].

В настоящее время проводятся интенсивные исследования по поиску новых препаратов для лечения COVID-19, в т. ч. изыскание альтернативных противовирусных методов лечения [1, 11–14]. Перспективными источниками анти-SARS-CoV-2 являются морские организмы, продуцирующие уникальные химические соединения, включая полисахариды, аминокислоты, гликозиды, полифенолы, алкалоиды, терпеноиды, пептиды, стероиды и др., проявляющие противовирусную активность [15–21] (что вполне закономерно, учитывая колоссальное количество и многообразие вирусов Океана [22]). Морские микроорганизмы выгодно отличаются от других морских источников, поскольку имеют высокие темпы роста и продуктивности биомассы [20]. Полисахариды морских бактерий (ПС) — это углеводородные биополимеры, секретируемые одноклеточными микроорганизмами, представителями морской флоры и фауны, которые могут находиться на внешней поверхности клеточных стенок, в слизистой капсуле или в окружающей среде [15, 21]. Микробные ПС могут существовать в виде гомо- или гетерополисахаридов с различными свойствами, такими как состав моносахаридов, структурная конформация, молекулярная масса и функциональные группы. Благодаря полимерной повторяющейся структуре

эти ПС способны к поливалентным взаимодействиям, которыми не обладают мономерные полисахариды. В этой связи ПС могут быть модифицированы путём присоединения лигандов, определяющих множественное связывание с рецепторами на поверхности клеток-мишеней [23] или вирусов [24].

ПС из морских микроорганизмов представляют собой безопасные, биоразлагаемые и биосовместимые полимеры и проявляют широкий спектр биологической активности, в числе которой способность оказывать иммуномодулирующие и противовирусные эффекты, в связи с чем привлекают пристальное внимание учёных как перспективный источник противовирусных лекарственных субстанций [15, 20, 21, 23–25].

Цель работы — оценка влияния ПС из 3-х разных видов морских бактерий на экспрессию поверхностных маркеров активации клеток врождённого иммунитета и изучение противовирусной активности этих ПС в отношении вируса SARS-CoV-2.

Материал и методы

Полисахариды из морских микроорганизмов были получены в лаборатории морской гликобиологии Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН:

- ПС1 выделен из *Pseudoalteromonas nigrifaciens* KMM 156 и состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка L-Rha, один остаток 2-ацетиламино-2-дезоксид-D-глюкозы (D-GlcpNAc) и один остаток 3-O-[(R)-1-карбокситил]-D-глюкозы [α -D-Glcp3(R-Lac)], глюколактиловой кислоты [26] (рис. 1).

- ПС2 выделен из *Cobetia litoralis* KMM 3890T и представляет O-специфический полисахарид, состоящий из раз-

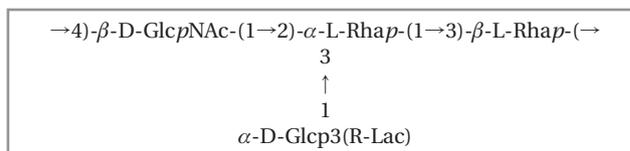


Рис. 1. Структура ПС1.
Fig. 1. Structure of PS1.

ветвлённых трисахаридных повторяющихся звеньев, состоящих из D-глюкозы (D-GlcP), D-маннозы (D-Manp) и сульфатированной по положению O-5 3-дезоксид-D-манноокт-2-улозоновой кислоты (Kдоp5S) [27] (рис. 2).

• ПС3 выделен из *Idiomarina abyssalis* КММ 227Т и также представляет O-специфический полисахарид, состоит из сульфатированных пентасахаридных повторяющихся звеньев и содержит два остатка 2-ацетиамидо-2-дезоксид-D-глюкуроновой кислоты (D-GlcPNAcA), L-рамнозы (L-Rhap), 2,4-диацетиамидо-2,4,6-тридезоксид-D-глюкозы (D-QuipNAc4NAc), а также сульфатированный по положению O-2 остаток 3,6-дидезокси-3-(4-гидроксибутирамидо)-D-глюкозы [D-Quip2S3N(4Hb)] [28] (рис. 3).

Цитометрические методы осуществлялись с использованием периферической крови с гепарином (25 ЕД/мл), полученной от здоровых доноров ($n=6$), не страдавших инфекционными заболеваниями и не предъявлявших на момент обследования жалоб соматического характера. Все доноры дали письменное информированное согласие на участие в исследовании, и протокол исследования был одобрен Комитетом по этике «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора (протокол № 2 от 16.11.2021). Исследуемые ПС вносили в кровь в конечной концентрации 100 мкг/мл (оптимальную дозу определили в предварительных экспериментах). В контрольные пробы вносили физиологический раствор. Уровень экспрессии молекул оценивали через 24 ч методом цитометрического анализа в программе «Cell Quest» на проточном цитометре BD FACSCalibur («Becton Dickinson»), США с использованием моноклональных антител к молекулам CD56-FITC, CD56-PE, CD3-APC, TLR2-PE, TLR4-PE, HLA-DR-PE, CD69-PE, CD62L-FITC, CD62L-PE, CD11b-PE, CD54-PE, CD14-FITC, CD16-PE («Beckman Coulter») и соответствующих изотипических контролей. Гейтирование субпопуляций гранулоцитов, основную часть которых составляют нейтрофилы, осуществляли по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. Моноциты дифференцировали от других клеток по параметрам FSC и SSC, а также по экспрессии клетками молекул CD14. NK-клетки идентифицировали как CD3-CD56+ клетки. В каждой пробе анализировали не менее 10^4 клеток.

Вирусный штамм SARS-CoV-2/Vladivostok/5130/2020 (Ухань-подобный генотип В1.1.397) был получен из коллекции ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора (ID в VGARus prim000098, GISAID EPI_ISL_16756941, GenBank OQ363272) [9]. Штамм был выделен из назофарингеального смыва пациента с клинически и лабораторно подтверждённым диагнозом COVID-19 путём последовательного пассирования на модели культуры клеток почки африканской зелёной марышки (Vero E6), полученной из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии (ВЕКТОР, Новосибирск, Россия). Штамм накапливали в Vero E6 с использованием среды DMEM (Биолот, Санкт-Петербург, Россия), в которую добавляли 10% эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) (Биолот, Санкт-Петербург, Россия) и 100 ЕД/мл гентамицина (Дальхимфарм, Хабаровск, Россия) при 37°C, 5% CO₂. В поддерживающей среде концентрация ЭТС была снижена до 1%. Концентрация клеток во всех опытах составляла 10^4 клеток/мл. Инфекционный титр SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6 после 5-го пассажа составил 5,8 lg(TCID₅₀/мл) (50% tissue cytopathic infectious dose per 1 ml — 50% тканевых цитопатических инфекционных доз в 1 мл). Все эксперименты с инфекционным вирусом проводились в помещении с уров-

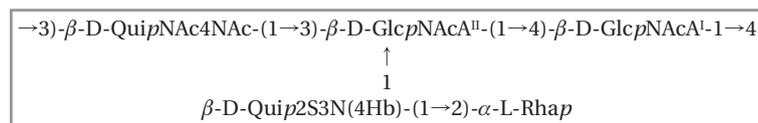


Рис. 3. Структура ПС3.
Fig. 3. Structure of PS3.

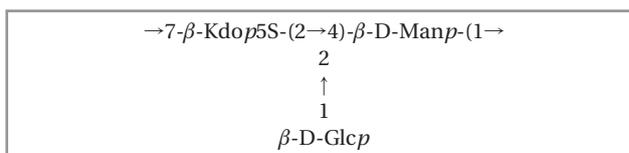


Рис. 2. Структура ПС2.
Fig. 2. Structure of PS2.

нем биологической безопасности 3 ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-ПВ) проводилась с помощью набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР-ПВ (Синтол, Россия) на анализаторе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Цитотоксическая активность соединений оценивалась с учётом жизнеспособности клеток в МТТ-тесте [29–31]. На 24-часовой монослой клеток, выращенных в 96-луночных планшетах наносили тестируемые вещества в различных концентрациях (5–2000 мкг/мл) и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 сут. После инкубации добавляли 5 мг/мл МТТ (бромид метилтиазаолитетразолия) (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали 2 ч при 37°C. Клетки с внутриклеточными кристаллами формазана растворяли изопропанолом. Оптическую плотность измеряли при $\lambda=540$ нм на планшетном ридере (LabSystems). Индекс цитотоксичности (CI(C) — cytotoxicity index) при данной концентрации (C) тестируемого препарата — полисахаридов (ПС) и Рибавирина® (референтный препарат) — рассчитывали по формуле:

$$CI(C) = (1 - D_s/D_0) \times 100\% (1)$$

где D_s — оптическая плотность в МТТ-тесте клеток, обработанных тестируемыми соединениями; D_0 — оптическая плотность в МТТ-тесте контрольных (не обработанных тестируемыми соединениями) клеток. Значение 50% цитотоксической дозы (CD_{50} — 50% the cytotoxicity dose), вдвое снижающей жизнеспособность клеток по сравнению с контролем, рассчитывали с помощью линейно-логарифмической интерполяции как корень уравнения

$$CI(CD_{50}) = 50\% (2)$$

Максимально нецитотоксической дозой (MNCD — maximum non-cytotoxic dose) тестируемых соединений считалась концентрация, удовлетворяющая уравнению:

$$CI(MNCD) = 10\% (3)$$

Изучение анти-SARS-CoV-2 активности исследуемых соединений на ранние стадии жизненного цикла SARS-CoV-2 изучали с помощью оценивания уровня подавления цитопатогенного действия (ЦПД) вируса (с помощью МТТ-теста) и репликации вируса (с помощью ОТ-ПЦР-ПВ). Монослой клеток Vero E6, выращенный в 96-луночных планшетах, инфицировали штаммом SARS-CoV-2/Vladivostok/5130/2020 в дозах 1,0 lg(TCID₅₀/мл) и 2,0 lg(TCID₅₀/мл); ПС и Рибавирин добавляли в концентрациях от 5 мкг/мл до 500 мкг/мл и при MNCD (см. далее) (ОТ-ПЦР-ПВ) по нескольким схемам, согласно [17, 18]: клетки обрабатывали ПС или Рибавирином за 1 ч до инфицирования (профилактическое действие); в другом варианте клетки обрабатывали вирусом и ПС или Рибавирином одновременно (одновременное действие). Обработанные клетки инкубировали в течение 5 сут при 37°C, 5% CO₂.

• МТТ-тест для оценки анти-SARS-CoV-2-активности исследуемых соединений в конкретной концентрации оценивали на основе индекса защиты ($PI(C)$ — protection index):

$$PI(C) = (D_{si} - D_1)/(D_0 - D_1) \times 100\% (4)$$

где D_0 — оптическая плотность в МТТ-тесте контрольных (не обработанных тестируемыми соединениями) клеток; D_1 — оптическая плотность в МТТ-тесте инфицированных клеток без препарата;

D_{si} — оптическая плотность в МТТ-тесте инфицированных клеток в присутствии препарата.

Значение 50% эффективной дозы (ED_{50} — 50% effective dose) рассчитывали с помощью линейно-логарифмической интерполяции как корень уравнения

$$PI(ED_{50}) = 50\% \quad (5)$$

Итоговая противовирусная активность соединения оценивалась с использованием индекса селективности (SI — selectivity index):

$$SI = CD_{50}/ED_{50} \quad (6)$$

• ОТ-ПЦР-РВ для оценки анти-SARS-CoV-2-активности исследуемых соединений проводили, как описано выше, на основе порогового цикла амплификации (C_t — threshold amplification cycle). Значение $C_t \geq 36$ принималось за отсутствие в образцах РНК SARS-CoV-2.

Индекс протекции по результатам ОТ-ПЦР-РВ ($PCRPI(C)$ — PCR-based protection index) для исследуемых соединений в конкретной концентрации оценивали по формуле:

$$PCRPI(C) = \frac{C_{tsi} - C_{ci}}{2^0 - C_{ci}} \times 100\% \quad (7)$$

где C_{t0} — значение C_t в ОТ-ПЦР-РВ для контрольных (не обработанных тестируемыми соединениями) клеток; C_{ci} — значение C_t в ОТ-ПЦР-РВ для инфицированных клеток без препарата; C_{tsi} — значение C_t в ОТ-ПЦР-РВ для инфицированных клеток в присутствии препарата. Все отрицательные значения $C_t \geq 36$ округлялись до 36 (в частности, заведомо $C_{t0} = 36$). Легко видеть, что $PCRPI(C)$, если тестируемый препарат абсолютно не обладает никакой способностью снижать репродукцию вируса (т. е. $C_{tsi} = C_{ci}$), и $PCRPI(C) = 100\%$, если тестируемый препарат полностью подавляет вирусную репродукцию (т. е. $C_{tsi} = C_{t0}$).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью Statistica ver. 10.0 (StatSoft, Польша) и макросов собственных разработок в MS Excel ver. 2010 (Microsoft, США).

Таблица 1. Уровень экспрессии молекул на поверхности клеток врожденного иммунитета после инкубации с полисахаридами (ПС) (100 мкг/мл)

Table 1. The level of molecules expression on the surface of innate immune cells after incubation with polysaccharides (100 µg/ml)

№ образца	Антигены (маркеры) клеточной мембраны нейтрофилов						
	CD69	CD62L	CD11b	TLR2	TLR4	CD14	CD16
	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI
Контроль	20,5±1,4	106,0±4,3	303,0±10,8	39,8±0,6	14,3±1,5	17,7±1,4	1326,2±25,1
ПС1	109,0±5,4*	14,4±1,5*	2191,0±52,1*	36,6±1,1	17,7±1,8*	21,8±4,3	782,0±29,0*
ПС2	30,6±1,3*	17,2±1,6*	1630,0±36,7*	44,8±1,02*	10,0±1,04	172,0±9,4*	2040,1±81,8*
ПС3	46,3±4,1*	13,2±1,4*	1789,0±38,9*	45,2±1,97*	13,1±1,2	114,0±5,5*	1096,0±3,1*
№ образца	Антигены (маркеры) клеточной мембраны моноцитов						
	CD62L	CD11b	TLR2	TLR4	CD14	CD16	
	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	
Контроль	34,1±0,6	733±38,1	117±18,7	15,4±0,5	1461±20,5	24,8±1,5	
ПС1	29,0±0,8*	1816±111,9*	103±6,9	30±1,8*	1102±28,6*	65,4±2,9*	
ПС2	30,1±0,4*	1221±63,4*	226±11,1*	13,0±0,4	1742±33,5*	40,2±2,9*	
ПС3	30,6±0,6*	1040±47,2*	132±7,6	19,9±0,6*	1614±21,9*	56,8±3,02*	
№ образца	Антигены (маркеры) клеточной мембраны NK-клеток						
	CD62L	CD11b	CD56bright	CD16	HLA-DR	CD54	
	MFI	MFI	%	MFI	%	%	
Контроль	45,5±0,8	131±16,9	10,4±1,3	398±40,4	4,3±0,3	15,0±1,2	
ПС1	39,9±0,7*	608±10,2*	26,1±1,3*	262±14,5*	13,9±0,6*	69,8±3,9*	
ПС2	45,5±0,8	193±14,9*	14,0±2,0	314±45,8	4,9±0,4	33,5±3,4*	
ПС3	46,6±0,9	186±15,7*	12,2±1,3	274±10,9*	9,9±0,5*	63,2±2,2*	

Примечание. Показатели $M \pm m$, $n=6$; * — различия значимы по отношению к контролю уровень достоверности $p < 0,05$ MFI (mean fluorescence intensity) — средняя интенсивность флуоресценции — отражает количество молекул, экспрессированных на клеточной мембране; % — процент клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры.

Note. The results were shown as $M \pm m$, $N=6$; * — marks confidence level $P < 0,05$ — the differences are significant in relation to the control; MFI (mean fluorescence intensity) — reflects the number of molecules expressed on the cell membrane; % — average percentage of cells expressing corresponding markers.

Выборочные данные характеризовали с помощью среднего значения (M) и стандартного отклонения выборочного среднего (m) в форме $M \pm m$. Оценку различий для групп экспериментальных значений проводили с использованием критерия Манна-Уитни-Вилкоксона с пороговым уровнем значимости.

Результаты

Как известно, движение к очагу воспаления нейтрофилов, являющихся одними из главных эффекторных клеток врожденного иммунитета, начинается с серии адгезионных событий, каждое из которых связано с изменением экспрессии ряда поверхностных молекул, в частности селективных и интегринов.

При изучении уровня экспрессии молекул адгезии нейтрофилами под влиянием исследуемых ПС установлено, что значительно по сравнению с контролем ($p < 0,05$) уменьшалась экспрессия L-селектинов (CD62L), но увеличивалась экспрессия интегринов (CD11b) на мембранах клеток, что свидетельствует о мобилизации и активации эффекторных клеток, готовности их к миграции. Наибольший эффект по интенсивности экспрессии CD11b на нейтрофилах оказывал ПС1, увеличивая этот показатель до $2191 \pm 52,1$ при контрольных значениях $303 \pm 10,8$ ($p < 0,05$) (табл. 1).

Также наблюдалось увеличение плотности экспрессии молекул активации CD69 и сигнальных молекул CD14 на нейтрофилах (см. табл. 1).

Молекулы CD69 относятся к самым ранним индуцибельным поверхностным маркерам, которые не экспрессируются на интактных клетках, а появляются после активации клеток различными стимулами.

Под влиянием ПС1 увеличивалась экспрессия мембранных молекул TLR4, а под влиянием ПС2 и ПС3 — TLR2 на нейтрофилах. Для TLR характерна низкая плотность экспрессии по отношению к другим мембраносвязанным белкам. Маркер TLR4, экспрессируется на всех нейтрофильных гранулоцитах, его основной функцией является распознавание липополисахаридов грамотрицательных бактерий [32], а интенсивность его экспрессии быстро увеличивается в ответ на воздействие PAMP (pathogen-associated molecular patterns) инфекционных агентов и уменьшается при отсутствии взаимодействия с лигандами [33].

Однако одним из функциональных ограничений данного маркера является тот факт, что его распознавание возможно только при условии экспрессии на клеточной мембране вспомогательной корецепторной молекулы CD14. Последующий запуск каскада процессов активации нейтрофилов после взаимодействия комплекса TLR4–CD14 с лигандом регулируется со стороны иммунной системы большим количеством цитокинов и других регуляторных молекул [34]. Под влиянием ПС2 и ПС3 наблюдалось увеличение экспрессии сигнальной молекулы CD14 на нейтрофилах в 6–10 раз по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Кроме того, ПС1 и ПС3 снижали уровень экспрессии низкоаффинного рецептора для Fc-фрагмента иммуноглобулинов CD16, а ПС2 увеличивал этот показатель (см. табл. 1). CD16 экспрессируется на поверхности нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, NK-клеток и играет важную роль в стимуляции мобилизации Ca^{2+} и дегрануляции нейтрофилов, а также способен активировать дегрануляцию, фагоцитоз и окислительный взрыв, которые обеспечивают удаление опсонизированных патогенов нейтрофилами [35].

Влияние исследуемых ПС на экспрессию молекул адгезии моноцитами было аналогично с их действием на нейтрофилы: снижение уровня экспрессии CD62L и возрастание CD11b, причём наибольший эффект на экспрессию CD11b оказывал ПС1. Все ПС индуцировали значимые изменения уровня рецепторов TLR на мембранах моноцитов: ПС1 и ПС3 увеличивали уровень экспрессии TLR4, а ПС2 приводил к возрастанию TLR2 (см. табл. 1).

Известно, что микробные ЛПС и ПС на первом этапе иницируют в клетке два основных процесса, связанных с изменением количества рецепторов CD14: слушивание (shedding) молекул с мембран и транслокацию внутриклеточных молекул на поверхность клетки. В зависимости от того, какой из процессов преобладает, наблюдается уменьшение или увеличение мембранных

молекул и возрастание молекул растворимых рецепторов CD14 (sCD14), играющих роль в транспортровке ЛПС к мембранам клеток [36]. В нашем случае ПС1 снижал, а ПС2 и ПС3 увеличивали уровень экспрессии CD14 на моноцитах.

Все ПС вызывали возрастание экспрессии CD16, в большей степени ПС1, увеличивая плотность этих молекул (MFI) до $65,4 \pm 2,9$ при контрольных показателях $24,8 \pm 1,5$ (см. табл. 1). Таким образом, увеличивалась популяция моноцитов CD14+CD16+, которая характеризуется более высоким уровнем фагоцитоза, продукции провоспалительных цитокинов и большим потенциалом антигенпредставляющей функции [37].

Главная функция NK-клеток — элиминация заражённых и повреждённых клеток организма. На основе плотности молекул CD56 и CD16 на клеточной поверхности выделяют две подгруппы NK-клеток человека: NK-клетки CD56^{dim}CD16^{bright} и CD56^{bright}CD16^{dim}, каждая из которых играет особую роль в иммунном ответе человека. В периферической крови более 90% NK-клеток принадлежат к субпопуляции CD56^{dim}CD16^{bright}, которые являются медиаторами цитотоксичности. Они экспрессируют высокий уровень киллерных иммуноглобулиноподобных рецепторов (KIR), низкий уровень CD94/NKG2A, а также экспрессируют CXCR1, рецептор провоспалительного цитокина IL-8. Напротив, субпопуляция NK-клеток CD56^{bright}CD16^{dim} составляет менее 10% NK-клеток периферической крови, обладает сниженной цитотоксической активностью, доминирует в лимфатических узлах, а также тканях, отвечая за продукцию цитокинов и хемокинов. Активацию NK-клеток индуцирует появление CD56^{bright} NK-клеток, способных продуцировать провоспалительные цитокины IFN- γ , TNF- α и IL-12 [38].

В результате нашего исследования установлено, что субпопуляционный состав NK-клеток изменился следующим образом: увеличилось относительное количество способных продуцировать цитокины CD56^{bright} NK-клеток под действием ПС1 до $26,1 \pm 1,3\%$ (в контроле — $10,4 \pm 1,3\%$). При этом плотность рецепторов CD16 значимо снизилась после инкубации NK-клеток с ПС1 и ПС3. Отмечено также возрастание плотности молекул адгезии CD11b на NK-клетках под действием ПС, но эффект ПС1 был более выражен по сравнению с ПС2 и ПС3. Значимое снижение селектина CD62L наблюдалось только при инкубации клеток крови с ПС1 (см. табл. 1). Изменение экспрессии молекул адгезии определяет особенности активации и осуществление эффекторных функций клеток.

Исследуемые ПС увеличивали относительное количество NK-клеток, экспрессирующих маркеры иммуноглобулинов CD54, а ПС1 и ПС3 увеличивали и экспрессию маркера активации

Таблица 2. Анти-SARS-CoV-2 активность полисахаридов из морских бактерий (МТТ-тест)

Table 2. Anti-SARS-CoV-2 activity of polysaccharides from marine bacteria (MTT assay)

Соединения	Профилактическое действие				Одновременное действие			
	1,0 lg(TCID ₅₀ /мл)		2,0 lg(TCID ₅₀ /мл)		1,0 lg(TCID ₅₀ /мл)		2,0 lg(TCID ₅₀ /мл)	
	ED ₅₀ , мкг/мл	SI	ED ₅₀ , мкг/мл	SI	ED ₅₀ , мкг/мл	SI	ED ₅₀ , мкг/мл	SI
ПС1	185±20	10,8±1,3	410±45	4,9±0,6	63±7	31,6±3,0	96±10	20,8±2,5
ПС2	128±14	15,6±1,7	253±28	7,9±0,9	83±9	24,0±2,5	182±20	10,9±1,3
ПС3	238±26	8,4±0,9	581±64	3,4±0,4	113±12	17,7±1,9	289±32	6,9±0,9
Рибавирин	Н/а		Н/а		160±18	4,6±0,6	207±23	3,5±0,4

Примечание. Результаты представлены $M \pm \sigma$ и включают данные трех экспериментов; ED₅₀ — 50% вирус-ингибирующая концентрация соединений; SI — селективный индекс соединений ($SI = CD_{50} / ED_{50}$); TCID₅₀/мл — 50% тканевая цитопатическая инфекционная доза вируса; Н/а — нет активности.

Note. The results were shown as $M \pm \sigma$ and include data of 3 experiments; ED₅₀ — 50% virus inhibition concentration of the compounds; SI — selective index of compounds ($SI = CD_{50} / ED_{50}$); TCID₅₀/ml — 50% tissue cytopathic infectious dose of the virus; Н/а — no activity.

HLA-DR (см. табл. 1). Молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 (CD54) экспрессируются на клетках при активации и участвуют в обеспечении адгезии нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов к активированному сосудистому эндотелию с последующей их экстравазацией и миграцией в очаг воспаления. Молекулы CD54 также функционируют как сигнальные и принимают участие в передаче сигнала с клеточной мембраны внутрь клетки и запуске каскада событий, результатом чего является продукция супероксидных радикалов [39].

HLA-DR-экспрессирующие НК-клетки проявляют большую литическую способность и экспрессируют хемокиновый рецептор, связанный как с привлечением клеток к очагу воспаления, так и с возвращением их в лимфатический узел. Показано, что HLA-DR-экспрессирующие НК-клетки могут играть существенную роль во время инициации и усиления воспалительных реакций, обеспечивая регуляцию иммунного ответа. Кроме того, выявлена корреляция между процентом НК-клеток, экспрессирующих HLA-DR, и уровнем транскрипции генов IFN- γ НК-клетками [40].

Экспрессия маркера CD16 на НК-клетках под влиянием ПС снижалась (см. табл. 1). Известно, что связывание НК-клеток с лигандом CD16 индуцирует транскрипцию мембранных активных белков, таких как IL-2-R (CD25) и провоспалительных цитокинов IFN- γ и TNF- α [41].

Таким образом, ПС эффективно воздействуют на клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы, моноциты и НК-клетки), увеличивая уровень экспрессии активационных и сигнальных молекул. Наиболее выраженное действие оказывает ПС1.

В следующей серии экспериментов проведена оценка цитотоксичности исследуемых ПС, которая показала, что эти соединения обладали низкой цитотоксической активностью по отношению к Vero E6: $CD_{50} > 2000$ мкг/мл; MNCD = 250±23 мкг/мл. Для Рибавирина как референсного препарата $CD_{50} = 730 \pm 88$ мкг/мл, MNCD = 150±18 мкг/мл.

Исследование влияния ПС на ранние стадии жизненного цикла SARS-CoV-2 продемонстрировало, что эти соединения наиболее эффективно подавляли репликацию вируса при условии одновременной обработки клеток Vero E6 вирусом и ПС. По данным МТТ-теста наиболее высокую противовирусную активность проявлял ПС1: при заражающей дозе 2,0 lg(TCID₅₀/мл), $CD_{50} = 96,0$ мкг/мл; при заражающей дозе 1,0 lg(TCID₅₀/мл) (табл. 2, рис. 1). Необходимо отметить, что при предварительной обработке клеток ПС (профилактическое действие) более высокая ингибирующая активность отмечена для ПС2 (табл. 2, рис. 4). При этом Рибавирин проявлял незначительную анти-SARS-CoV-2 активность только при одновременном воздействии на клетки.

Анти-SARS-CoV-2 активность ПС из морских бактерий была также изучена с использованием ОТ-ПЦР-РВ. Наиболее выраженное снижение уровня РНК SARS-CoV-2 обнаружено при одновременном воздействии ПС при MNCD = 250 мкг/мл и заражающей дозе 2,0 lg(TCID₅₀/мл) на Vero E6 (табл. 3). Установлено, что при указанных условиях ПС1 наиболее эффективно подавляет репродукцию вируса (по сравнению с контролем), защищая в среднем 42% инфицированных клеток ($p < 0,05$). При этом индексы протекции ПС2 и ПС3 составляли 22 и 15%, соответственно. В то же время при предварительной обработке клеток исследуемыми соединениями в концентрации 250 мкг/мл и при инфекционной дозе вируса 2,0 lg(TCID₅₀/мл) снижение вирусной репродукции было менее выраженным, и индекс протекции в среднем для всех полисахаридов составлял около 9% (см. табл. 3).

Таким образом, результаты, полученные как в тесте ингибирования цитопатогенного действия вируса (МТТ-тест), так и по снижению уровня РНК вируса SARS-CoV-2 (ОТ-ПЦР-РВ) продемонстрировали антикоронавирусную активность исследуемых ПС. Наибольший эффект показал ПС1, который проявляет значительную антикоронавирусную активность, эффективно

Таблица 3. Анти-SARS-CoV-2 активность полисахаридов из морских бактерий (ОТ-ПЦР-РВ)
Table 3. Anti-SARS-CoV-2 activity of polysaccharide from marine bacteria (RT-PCR)

Соединения	Профилактическое действие			Одновременное действие		
	C_{tsi}	$C_{tsi} - C_{ti}$	$\frac{C_{tsi} - C_{ti}}{(2^{C_{to} - C_{ti}} - 1)} \times 100, \%$	C_{tsi}	$C_{tsi} - C_{ti}$	$\frac{C_{tsi} - C_{ti}}{(2^{C_{to} - C_{ti}} - 1)} \times 100, \%$
ПС1	18,8±2,2*	2,4±0,3	8,8±1,1	26,3±3,4*	9,9±1,3	41,9±5,0
ПС2	19,9±2,4*	3,5±0,4	13,1±1,7	22,0±2,6*	5,6±0,7	21,9±2,8
ПС3	17,9±2,1*	1,5±0,2	5,4±0,7	20,3±2,4*	3,9±0,5	14,8±1,8
Рибавирин	16,9±1,9	0,5±0,1	1,7±0,2	19,8±2,2*	3,4±0,4	12,7±1,5

Примечание. C_t – пороговый цикл; C_{to} – значение C_t для контрольных клеток (не обработанных тестируемыми соединениями), ($C_{to}=36$); C_{ti} – среднее значение C_t для инфицированных клеток без препарата (контроль вируса), ($C_{ti}=16,4\pm1,8$); C_{tsi} – среднее значение C_t для инфицированных образцов после обработки полисахаридами. Показатели $M\pm m$ в трёх независимых экспериментах. * – уровень достоверности $p<0,05$ при сравнении показателей C_{tsi} с таковыми C_{ti} .

Note. C_t – the threshold cycle; C_{to} – C_t value for control cells (not treated with tested compounds), ($C_{to}=36$); C_{ti} – average C_t value for infected cells without the drug (virus control), ($C_{ti}=16.4\pm1.8$); C_{tsi} – average C_t value for infected samples after treatment with polysaccharides. The results were shown as $M\pm m$ and include data of 3 experiments. * – marks confidence level $P<0,05$ when comparing C_{tsi} values with C_{ti} values.

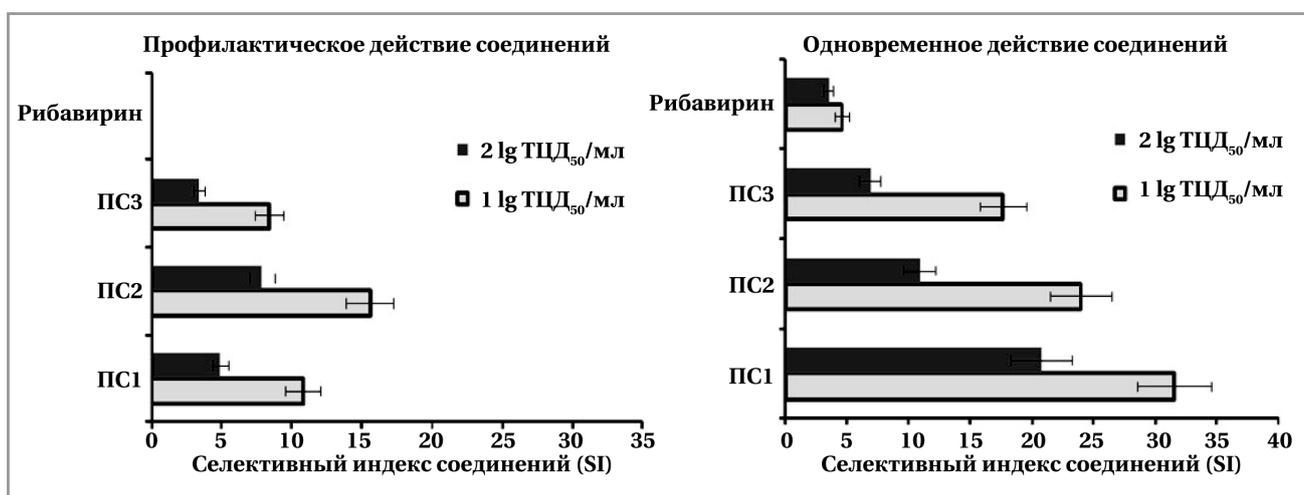


Рис. 4. Селективный индекс (SI) полисахаридов из морских бактерий при разных схемах их применения.
Fig. 4. The selective index (SI) of polysaccharides from marine bacteria in different application schemes.

ингибируя ранние стадии взаимодействия SARS-CoV-2 с клеткой.

Обсуждение

Как показали результаты проведённых исследований, наибольшую анти-SARS-CoV-2 и иммуномодулирующую активность проявил ПС1 из *P. nigrifaciens* КММ 156. Каждый из исследуемых образцов ПС имеет уникальную последовательность, конфигурацию и тип замещения индивидуальных моносахаридных остатков внутри повторяющейся структурной единицы. Кроме того, ПС2 и ПС3 являются сульфатированными по определённому положению в отличие от ПС1.

Тестирование исследуемых ПС в МТТ-тесте показало, что эти соединения обладают низкой цитотоксической активностью по отношению к Vero E6: $CD_{50} > 2000$ мкг/мл.

Что касается токсичности микробных ПС, ранее нами было показано, что эти ПС нетоксичны

при парентеральном введении лабораторным животным и не индуцируют апоптоз лимфоцитов и нейтрофильных лейкоцитов периферической крови человека [42]. Также ранее нами выявлено иммунокорректирующее и противовирусное действие ПС из *P. nigrifaciens* КММ 156 в отношении вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) (*Amarillovirales: Flaviviridae, Flavivirus*). Максимальная концентрация этого ПС (1000 мкг/мл) вызывала снижение титров вируса на 4,0 lg(TCID₅₀/мл), подавляя репродукцию вируса на 66,7% [43].

По данным ряда авторов механизмы противовирусного действия микробных ПС универсальны. Они реализуются как системно, так и при местном воздействии ПС. Системное действие ПС может проявляться путём стимуляции факторов врождённого и адаптивного иммунитета, реализации противовоспалительной, антиоксидантной и др. видов активности [44]. Ускорение элиминации вируса из организма может быть связано со стимуляцией функциональной активности клеток врождённого

иммунитета — пролиферации и цитотоксической активности NK-клеток и выработки провоспалительных цитокинов с противовирусной активностью (интерферонов 1-го типа) [44, 45]. NK-клетки одними из первых реагируют на вирусные инфекции. Цитотоксическая функция NK-клеток реализуется посредством разных механизмов, включая участие рецепторов апоптоза, лиганд Fas (FasL) и лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с фактором некроза опухоли (TRAIL), а также экзоцитоз цитолитических гранул, содержащих перфорины и гранзимы [46].

Механизм противовирусного действия ПС также может осуществляться путём блокирования прикрепления и проникновения вируса в клетки, ингибируя либо связывание вируса со специфическими рецепторами клеток хозяина, либо прямой инактивацией вирусных частиц [15, 24]. Так, ранее нами показано, что под воздействием ПС из *P. nigrifaciens* КММ 156 на клетки цельной крови, инфицированной ВКЭ, восстанавливалось индуцированное вирусом снижение экспрессии клеточных маркеров CD69, HLA-DR и CD107a на мембране моноцитов, NK и CD8+ Т-клеток и продукции иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, IFN α , IFN γ). Этот ПС ингибировал репликацию вируса в клетках линии СПЭВ (почки эмбриона свиньи), снижая количество инфицированных клеток и уровень вирусной нагрузки, т. е. проявлял выраженный противовирусный эффект [43].

Выводы

1. Исследуемые ПС из морских бактерий *P. nigrifaciens* КММ 156 (ПС1), *K. litoralis* КММ 3890Т (ПС2), *I. abyssalis* КММ 227Т (ПС3), различающиеся

по химической структуре, активируют клетки врождённого иммунитета (нейтрофилы, моноциты, естественные NK-киллеры), усиливая их способность к миграции, изменяя уровень экспрессии молекул адгезии и увеличивая их эффекторный потенциал.

2. ПС из морских бактерий проявляют антикоронавирусную активность, эффективно ингибируя ранние стадии взаимодействия SARS-CoV-2 с клеткой.

3. Исследуемые ПС можно считать перспективным источником противовирусных лекарственных субстанций, в т. ч. в борьбе с вирусом SARS-CoV-2. Однако для изучения углублённых механизмов противовирусного действия этих ПС требуются дальнейшие исследования.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках Государственного задания НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора № 141-00089-21-00 на 2021–2025 гг. и Государственного задания Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН № 124042700016-1 на 2024–2026 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Смолина Т.П., Крылова Н.В., Иванушко Л.А., Гажа А.К., Персиянова Е.В., Майстровская О.С., Гапека А.В., Белов Ю.А. — выполнение методик, получение данных для анализа, анализ и интерпретация результатов; Кузнецова Т.А. — постановка проблемы, анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование; Кокоулин М.С. — выделение полисахаридов; Щелканов М.Ю. — анализ данных, редактирование, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

1. Щелканов М. Ю., Колобухина Л. В., Бургасова О. А., Кружкова И. С., Малеев В. В. COVID-19: этиология, клиника, лечение. Инфекция и иммунитет 2020; 10 (3): 421–445. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CEC-1473>. [Shchelkanov M. Yu., Kolobukhina L. V., Burgasova O. A., Kruzhkova I. S., Maleev V. V. COVID-19: etiology, clinic, treatment. Russian Journal of Infection and Immunity, 2020; 10 (3): 421–445. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CEC-1473>. (in Russian)]
2. Щелканов М. Ю. Этиология COVID-19. В кн.: COVID-19: от этиологии до вакцинопрофилактики. Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023; 11–53. doi: <https://doi.org/10.33029/9704-7967-4-COV-2023-1-288>. [Shchelkanov M. Yu. Etiology of COVID-19. In book: COVID-19: from etiology to vaccination. A guide for doctors. Moscow: GEOTAR-Media, 2023; 11–53. doi: <https://doi.org/10.33029/9704-7967-4-COV-2023-1-288>. (in Russian)]
3. Щелканов М. Ю., Попова А. Ю., Дедков В. Г., Акимкин В. Г., Малеев В. В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). Инфекция и иммунитет, 2020; 10 (2): 221–246. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-H01-1412>. [Shchelkanov M. Yu., Popova A. Yu., Dedkov V. G., Akimkin V. G., Maleev V. V. Research history of coronaviruses. Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, 10 (2): 221–246. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-H01-1412>. (in Russian)]
4. Пульмонология. Национальное руководство. Краткое издание. Ред.: А. Г. Чучалин. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013; 800. [Pulmonology. National leadership. Short edition. A. G. Chuchalin (ed.). Moscow: GEOTAR-Media, 2013; 800. (in Russian)]
5. Щелканов М. Ю., Ананьев В. Ю., Кузнецов В. В., Шуматов В. Б. Ближневосточный респираторный синдром: когда вспыхнет тлеющий очаг? Тихоокеанский медицинский журнал. 2015; 2: 94–98. [Shchelkanov M. Yu., Ananiev V. Yu., Kuznetsov V. V., Shumatov V. B. Middle East respiratory syndrome: when will smouldering focus outbreak? Tikhookeanskiy Meditsin-Skiy Zhurnal = Pacific Medical Journal, 2015; 2: 94–98. (In Russ.)]
6. Щелканов М. Ю., Ананьев В. Ю., Кузнецов В. В., Шуматов В. Б. Эпидемическая вспышка Ближневосточного респираторного синдрома в Республике Корея (май–июль 2015 г.): причины, динамика, выводы. Тихоокеанский медицинский журнал. 2015; 3: 89–93. [Shchelkanov M. Yu., Ananiev V. Yu., Kuznetsov V. V., Shumatov V. B. Epidemic outbreak of Middle East respiratory syndrome in the Republic of Korea (May–July 2015): causes, dynamics, conclusions. Tikhookeanskiy Meditsin-Skiy Zhurnal = Pacific Medical Journal. 2015; 3: 89–93 (in Russian)]
7. Никифоров В. В., Колобухина Л. В., Сметанина С. В., Мазанкова Л. Н., Плавунин Н. Ф., Щелканов М. Ю. и соавт. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. М.: Департамент здравоохранения города Москвы, 2020; 71. URL: <https://elibrary.ru/hgqiyk> [Nikiforov V. V., Kolobukhina L. V., Smetanina S. V., Mazankova L. N., Plavinov N. F., Shchelkanov M. Yu. et al. Novel coronavirus infection (COVID-19): etiology, epidemiology, clinics, diagnostics, treatment, and prophylaxis. Educational and methodological guide. Moscow: Department of Public Health of Moscow city, 2020; 71 p. URL: <https://elibrary.ru/hgqiyk> (in Russian)]

8. Акимкин В. Г., Попова А. Ю., Плоскирева А. А., Углева С. В., Семенов Т. А., Пищеничная Н. Ю. и соавт. COVID-19: Эволюция пандемии в России. Сообщение I: проявления эпидемического процесса COVID-19. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2022; 99 (3): 269–286. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276>. [Akimkin V. G., Popova A. Yu., Ploskireva A. A., Ugleva S. V., Semenenko T. A., Pshenichnaya N. Yu. et al. COVID-19: The evolution of the pandemic in Russia. Message I: manifestations of the epidemic process COVID-19. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2022; 99 (3): 269–286. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276>. (in Russian)]
9. Попова А. Ю., Шелканов М. Ю., Крылова Н. В., Белик А. А., Семейкина Л. М., Запорожец Т. С. и соавт. Генотипический портрет SARS-CoV-2 на территории Приморского края в период пандемии COVID-19. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2024; 101 (1): 19–35. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-497>. [Popova A. Yu., Shchelkanov M. Yu., Krylova Natalia V., Belik A. A., Semeikina L. M., Zaporozhets T. S. et al. Genotypic portrait of SARS-CoV-2 in Primorsky Krai during the COVID-19 pandemic. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2024; 101 (1): 19–35. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-497>. (in Russian)]
10. Шелканов М. Ю., Колобухина Л. В., Львов Д. К. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности. Лечащий врач. 2013; 10: 49–54. [Shchelkanov M. Yu., Kolobukhina L. V., Lvov D. K. Human coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): increased level of epidemic threat. Lechashchiy Vrach = The Attending Physician, 2013; 10: 49–54. (in Russian)]
11. Грибова В. В., Окунь Д. Б., Шалфеева Е. А., Шеллов Б. О., Шелканов М. Ю. Облачный сервис для дифференциальной клинической диагностики острых респираторных вирусных заболеваний (в том числе — связанных с особо опасными коронавирусами) методами искусственного интеллекта. Якутский медицинский журнал. 2020; 2: 44–47. [Gribova V. V., Okun D. B., Shalfeeva E. A., Shcheglov B. O., Shchelkanov M. Yu. Cloud service for the differential clinical diagnostics of acute respiratory viral diseases (including those associated with highly contagious coronaviruses) with an application of methods of artificial intelligence. Yakut Medical Journal. 2020; 2: 44–47. (in Russian)]
12. Крылова Н. В., Федорев С. А., Иунихина О. В., Мищенко Н. П., Потт А. Б., Персиянова Е. В. и соавт. Средство, обладающее противовирусным действием в отношении коронавируса SARS-CoV-2. Патент Российской Федерации на изобретение RU 2788762 C1 по заявке 2022127457 с приоритетом от 24.10.2022; дата государственной регистрации: 24.01.2023; 12. [Krylova N. V., Fedorev S. A., Iunikhina O. V., Mishchenko N. P., Pott A. B., Persiyanova E. V. et al. A drug with antiviral effect against SARS-CoV-2 coronavirus. Patent of the Russian Federation for invention RU 2788762 C1 on application 2022127457 with priority from 24.10.2022; date of state registration: 01/24/2023; 12. (in Russian)]
13. Крылова Н. В., Иунихина О. В., Федорев С. А., Потт А. Б., Персиянова Е. В., Мищенко Н. П., и др. Анти-SARS-CoV-2 активность полифенольного комплекса из *Maackia aturensis*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023; 176 (8): 216–219. doi: <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-8-216-219>. [Krylova N. V., Iunikhina O. V., Fedorev S. A., Pott A. B., Persiyanova E. V., Mishchenko N. P. et al. Anti-SARS-CoV-2 activity of the polyphenol complex from *Maackia aturensis*. Bull Exp Biol and Med. 2023; 176 (8): 216–219. doi: <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-8-216-219>. (in Russian)]
14. Сомова Л. М., Котырбий Е. А., Дробот Е. И., Крылова Н. В., Ляпун И. Н., Шелканов М. Ю. Патоморфология лимфатических узлов в случаях тяжёлой инфекции, вызванной SARS-CoV-2, наблюдавшихся в Приморском крае. Клиническая и экспериментальная морфология. 2022; 11 (4): 16–24. doi: <https://doi.org/10.31088/CEM2022.11.4.16-24>. [Somova L. M., Kotsyurbiy E. A., Drobot E. I., Krylova N. V., Lyapun I. N., Shchelkanov M. Yu. Pathomorphology of lymph nodes in cases of severe infection caused by SARS-CoV-2 observed in Primorsky Krai. Clinical and Experimental Morphology. 2022; 11 (4): 16–24. doi: <https://doi.org/10.31088/CEM2022.11.4.16-24>. (in Russian)]
15. Kuznetsova T. A., Besednova N. N., Zaporozhets T. S., Kokoulin M. S., Khotimchenko Yu. S., Shchelkanov M. Yu. Antiviral Potential of Marine Bacterial Polysaccharides. Russian Journal of Marine Biology, 2024; 50 (3): 107–115. doi: <https://doi.org/10.1134/S1063074024700056>.
16. Bello-Morales R., Andreu S., Ruiz-Carpio V., Ripa I., López-Guerrero J. A. Extracellular polymeric substances: still promising antivirals. Viruses. 2022; 14 (6): 1337. doi: <https://doi.org/10.3390/v14061337>.
17. Krylova N. V., Silchenko A. S., Pott A. B., Ermakova S. P., Iunikhina O. V., Rasin A. B. et al. *In vitro* anti-orthohantavirus activity of the high- and low-molecular-weight fractions of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens*. Mar Drugs. 2021; 19 (10): 577. doi: <https://doi.org/10.3390/md19100577>.
18. Krylova N. V., Kravchenko A. O., Iunikhina O. V., Pott A. B., Likhatskaya G. N., Volod'ko A. V. et al. Influence of the structural features of carrageenans from red algae of the far eastern seas on their antiviral properties. Mar Drugs. 2022; 20 (1): 60. doi: <https://doi.org/10.3390/md20010060>.
19. O'Keefe, B. R., Giomarelli, B., Barnard, D. L., Shenoy, S. R., Chan, P. K., McMahon, J. B. et al. Broad spectrum *in vitro* activity and *in vivo* efficacy of the antiviral protein griffithsin against emerging viruses of the family Coronaviridae. J Virol. 2010; 84 (5): 2511–2521. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.02322-09>.
20. Mishra N., Gupta E., Walag AMP, Kharwar RN., Singh P., Mishra P. A review of marine natural product resources with potential bioactivity against SARS-CoV-2. Trop J Nat Prod Res. 2023; 7 (1): 2093–2103. doi: <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v7i1.2>.
21. Khotimchenko Yu. S., Shchelkanov M. Yu. Viruses of the Ocean: on the shores of the aqua incognita. Horizons of taxonomic diversity. Russian Journal of Marine Biology. 2024; 50 (1): 1–24. doi: <https://doi.org/10.31857/S0134347524010018>.
22. Bello-Morales R., Andreu S., Ruiz-Carpio V., Ripa I., López-Guerrero J. A. Extracellular polymeric substances: still promising antivirals. Viruses. 2022; 14 (6): 1337. doi: <https://doi.org/10.3390/v14061337>.
23. Bianculli R. H., Mase J. D., Schulz M. D. Antiviral polymers: past approaches and future possibilities. Macromolecules. 2020; 53(21): 9158–9186. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c01273>.
24. Besednova N. N., Andryukov B. G., Kuznetsova T. A., Zaporozhets T. S. Antiviral effects and mechanisms of action of water extracts and polysaccharides of microalgae and cyanobacteria. J Pharm Nutr Sci. 2022; 12: 54–73. doi: <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2022.12>.
25. Salimi F., Farrokhi P. Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides. World J Microbiol Biotechnol. 2023; 39: 213. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03660>.
26. Горшкова П. П., Назаренко Е. Л., Зубков А. А., Иванова Е. П., Оводов Ю. С., Шапков А. С., Книррель Ю. А. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида *Alteromonas haloplanktis* KMM156. Биоорганическая химия. 1993; 19 (3): 327–336. [Gorshkova P. P., Nazarenko E. L., Zubkov A. A., Ivanova E. P., Ovodov Y. S., Shashkov A. S., Knirel Yu. A. Struktura povtornyayushchegosya звена кислого полисахарида *Alteromonas haloplanktis* KMM156. Bioorgan Khimiya. 1993; 19 (3): 327–336. (in Russian)]
27. Kokoulin M. S., Kuzmich A. S., Kalinovsky A. I., Tomshich S. V., Romanenko L. A., Mikhailov V. V., Komandrova N. A. Structure and anticancer activity of sulfated O-polysaccharide from marine bacterium *Cobetia litoralis* KMM 3880T. Carbohydr Polym. 2016; 154: 55–61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.036>.
28. Kokoulin M. S., Komandrova N. A., Kalinovsky A. I., Tomshich S. V., Romanenko L. A., Vaskovskaya A. B. Structure of the O-specific polysaccharide from the deep-sea marine bacterium *Idiomarina abyssalis* KMM 227T containing a 2-O-sulfate-3-N-(4-hydroxybutanoyl)-3,6-dideoxy-d-glucose. Carbohydr. Res. 2015; 41: 100–106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.05.012>.
29. Шелканов М. Ю., Сахурия И. Б., Полякова Е. Б., Бурунова В. В., Пашкова Т. А., Корнилаева Г. В., Карамов Э. В. Повышение качества МТТ-метода с помощью микродозаторных наконечников специальной конструкции. Иммунология. 1998; 19, 4: 57–59. [Shchelkanov M. Yu., Sakhuria I. B., Polyakova E. B., Baranova V. V., Pashkova T. A., Kornilaeva G. V., Karamov E. V. Improving the quality of the MTT method using microdosing tips of a special design. Immunology. 1998; 19, 4: 57–59 (in Russian)]
30. Шелканов М. Ю., Сахурия И. Б., Бурунова В. В., Пашкова Т. А., Абэлян А. В., Павлова Т. В. и др. Дегидрогеназная активность ВИЧ-инфицированных клеток при анализе результатов МТТ-теста. Иммунология. 1999; 20: 1: 37–41. [Shchelkanov M. Yu., Sakhuria I. B., Burunova V. V., Pashkova T. A., Abelian A. V., Pavlova T. V. et al. Dehydrogenase activity of HIV-infected cells in the analysis of MTT test results. Immunology. 1999; 20: 1: 37–41 (in Russian)]
31. Шелканов М. Ю., Ерёмин В. Ф., Сахурия И. Б., Бурунова В. В., Павлова Т. В., Корнилаева Г. В., Карамов Э. В. Дегидрогеназная активность инфицированных клеток и биологические свойства различных вариантов ВИЧ-1. Биохимия. 1999; 64 (4): 513–519. [Shchelkanov M. Yu., Eremin V. F., Sakhuria I. B., Burunova V. V., Pavlova T. V., Kornilaeva G. V., Karamov E. V. Dehydrogenase activity of infected cells and biological properties of various HIV-1 variants. Biochemistry. 1999; 64 (4): 513–519. (in Russian)]
32. Lu Y. C., Yeh W. C., Ohashi P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008; 42 (2): 145–151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>.
33. Ahrens P., Kattner E., Köhler B., Härtel C., Seidenberg J., Segerer H., Möller J., Göpel W., Genetic Factors in Neonatology Study Group. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. Pediatr Res. 2004; 55 (4): 652–656. doi: <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000112100.61253.85>.
34. Hansson G. K., Edfeldt K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25(6): 1085–1087. doi: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000168894.43759.47>.
35. Zhang Y., Boesen C. C., Radaev S., Brooks A. G., Fridman W. H., Sautes-Fridman C. et al. Crystal structure of the extracellular domain of a

- human FcγRIII. *Immunity*. 2000; 13 (3): 387–395. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00038-8.
36. Landmann R., Knopf H. P., Link S., Sansano S., Schumann R., Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1996; 64 (5): 1762–1769. doi: 10.1128/iai.64.5.1762-1769.1996.
 37. Grage-Griebenow E., Flad H. D., Ernst M., Bzowska M., Skrzeczyńska J., Pryjma J. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology*. 2000; 202 (1): 42–50. doi: 10.1016/S0171-2985(00)80051-0.
 38. Fauriat C., Long E. O., Ljunggren H.-G., Bryceson Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010; 115(11): 2167–2176. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469.
 39. Takashi S., Okubo J., Horie S. J. Contribution of CD54 to human eosinophil and neutrophil superoxide production. *J Appl Physiol*. 2001; 91 (2): 613–622. doi: 10.1152/jappl.2001.91.2.613.
 40. Evans J. H., Horowitz A., Mehrabi M., Wise E. L., Pease J. E., Riley E. M. et al. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *Eur J Immunol*. 2011; 41 (7): 1924–1933. doi: 10.1002/eji.201041180.
 41. Mandelboim O., Malik P., Davis D. M., Jo C. H., Boyson J. E., Strominger J. L. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(12): 12501–12506. doi: 10.1073/pnas.125019898.
 42. Гажа А. К., Кузнецова Т. А., Смолина Т. П., Кокоулин М. С. Биологическая активность полисахаридов из морских бактерий. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2019; 3 (79): 23–26. doi: https://doi.org/10.5281/zenodo.3559614. [Gazha A. K., Kuznetsova T. A., Smolina T. P., Kokoulin M. S. Biologicheskaya aktivnost' polisaharidov iz morskikh bakterij. *Zdorov'e. Medicinskaya ekologiya. Nauka*. 2019; 3 (79): 23–26. doi: https://doi.org/10.5281/zenodo.3559614 (in Russian)]
 43. Крылова Н. В., Смолина Т. П., Берлизова М. В., Леонова Г. Н. Иммунокорректирующая и противовирусная активность полисахарида из морских бактерий в отношении вируса клещевого энцефалита. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019; 64 (11–2): 16–24. doi: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2019-64-11-12-16-24. [Krylova N. V., Smolina T. P., Berlizova M. V., Leonova G. N. Immunocorrective and antiviral activity of polysaccharide from marine bacteria against tick-borne encephalitis virus. *Antibiot Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2019; 64 (11–12): 16–24. doi: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2019-64-11-12-16-24. (in Russian)]
 44. Saadat Y. R., Khosroushahi A. Y., Gargari B. P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydr Polym*. 2019; 217: 79–89. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.025.
 45. van Erp E. A., van Kampen M. R., van Kasteren P. B., de Wit J. Viral infection of human natural killer cells. *Viruses*. 2019; 11 (3): 243. doi: 10.3390/v11030243.
 46. Smyth M. J., Cretney E., Kelly J. M., Westwood J. A., Street S. E., Yagita H. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005; 42: 501–510. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.034.

Поступила / Received 21.08.2024
Принята в печать / Accepted 30.09.2024

Информация об авторах

Смолина Татьяна Павловна — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0003-4505-3627

Крылова Наталья Владимировна — д. б. н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией респираторных инфекций ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-9048-6803

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д. м. н., главный научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-4315-6959

Иванушко Людмила Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0001-9525-668X

Гажа Анна Константиновна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-2672-1629

Персиянова Елена Викторовна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории респираторных инфекций ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-5686-8672

Майстровская Ольга Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории респираторных инфекций ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0009-0003-8013-4489

About the authors

Tatyana P. Smolina — Ph. D. in Biology, Leading Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0003-4505-3627

Natalya V. Krylova — D. Sc. in Biology, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Respiratory Infections, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-9048-6803

Tatyana A. Kuznetsova — D. Sc. in Medicine, Chief Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-4315-6959

Ludmila A. Ivanushko — Ph. D. in Medicine, Senior Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0001-9525-668X

Anna K. Gazha — Ph. D. in Medicine, Senior Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-2672-1629

Elena V. Persyanova — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Respiratory Infections, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-5686-8672

Olga S. Maistrovskaya — Junior Researcher at the Laboratory of Respiratory Infections, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0009-0003-8013-4489

Гапека Алёна Викторовна — младший научный сотрудник, отдел экспериментальной биомедицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0009-0000-3204-5017

Белов Юрий Александрович — младший научный сотрудник, Центр молекулярной диагностики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 000-0001-8313-5610

Кокчулин Максим Сергеевич — к. х. н., старший научный сотрудник лаборатории морской гликобиологии ФГБНУ «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН». ORCID: 0000-0003-2245-6802

Щелканов Михаил Юрьевич — д. б. н., директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия; заведующий кафедрой эпидемиологии, микробиологии и паразитологии Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета. ORCID: 0000-0001-8610-7623

Alena V. Gapeka — Junior Researcher, Department of Experimental Biomedicine, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0009-0000-3204-5017

Jurii A. Belov — Junior Researcher, Center of Molecular Diagnostics, G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0001-8313-5610

Maxim S. Kokoulin — Ph. D. in Chemistry, Senior Researcher, Laboratory of Marine Glycobiology, G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Science, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0003-2245-6802

Mikhail Yu. Shchelkanov — D. Sc. in Biology, Director of the G. P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0001-8610-7623

Оптимизация схемы деконтаминации перевиваемых культур клеток человека антибиотиками различного механизма действия

Т. А. ГРИГОРЬЕВА, А. А. ПОЖАРСКИЙ, Я. А. ГРИГОРЬЕВ,
Д. Н. КИНДТ, *Д. С. НОВИКОВА

НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

Резюме

При проведении экспериментов на клеточных культурах важным условием достоверности получаемых результатов является отсутствие контаминации. При этом долгосрочное культивирование существенно повышает риски заражения клеточного материала, в связи с чем возникает необходимость поддержания клеточной чистоты и удаления контаминантов в случае обнаружения заражения. В качестве контаминантов чаще всего выступают бактерии, дрожжи и грибы, в редких случаях вирусы и простейшие. Соответственно, для борьбы с биологическим заражением необходимо использовать препараты различной направленности в зависимости от природы контаминанта. В данной работе исследовано влияние наиболее распространённых в лабораторной практике препаратов антибиотической и антимикотической направленности на жизнедеятельность адгезивных перевиваемых клеточных культур человека. Показано, что разные клеточные культуры обладают различной чувствительностью к используемым для деконтаминации препаратам, что свидетельствует о необходимости разработки индивидуальных схем лечения для конкретной клеточной линии. Установлены безопасные диапазоны концентрации препаратов для клеток аденокарциномы лёгкого, остеосаркомы, колоректальной карциномы и эмбриональных клеток почки человека. С учётом полученных данных проведено лечение спонтанной контаминации в длительно культивируемом штамме линии H1299. Искусственное заражение исследуемых клеточных линий выявленным контаминантом с последующим лечением по аналогичной схеме подтвердило адекватность использования ципрофлоксацина для деконтаминации различных адгезивных культур в лабораторной практике.

Ключевые слова: контаминация; ципрофлоксацин; H1299; U2OS; HEK293; HCT116; микоплазма

Для цитирования: Григорьева Т. А., Пожарский А. А., Григорьев Я. А., Киндт Д. Н., Новикова Д. С. Оптимизация схемы деконтаминации перевиваемых культур клеток человека антибиотиками различного механизма действия. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 16–24. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-16-24>. EDN: OEYYZZ.

Optimization of the Scheme for Decontaminating Continuous Human Cell Cultures with Antibiotics of Different Mechanisms

TATYANA A. GRIGOREVA, ARTUR A. POZHARSKII, YAROSLAV A. GRIGOREV,
DARIA N. KINDT, *DARIA S. NOVIKOVA

St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia

Abstract

The absence of contamination is an important condition for the reliability of the results obtained when conducting experiments on cell cultures. At the same time, long-term cultivation significantly increases the risk of contamination of the cellular material, and therefore it is necessary to maintain cellular purity and remove contaminants in the event of contamination. The most common contaminants are bacteria, yeast and fungi, and, in rare cases, viruses and protozoa. Accordingly, to combat biological contamination, it is necessary to use drugs of different mechanisms depending on the nature of the contaminant. The article examines the effect of the most common antibiotic and antimycotic drugs in laboratory practice on the vital activity of continuous adherent human cell cultures. It was shown that different cell cultures have different sensitivity to the drugs used for decontamination, which indicates the need to develop individual treatment regimens for a specific cell line. Safe ranges of drug concentrations were established for lung adenocarcinoma, osteosar-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: dc.novikova@gmail.com



*Correspondence to:
E-mail: dc.novikova@gmail.com



EDN: OEYYZZ

coma, colorectal carcinoma, and human embryonic kidney cells. Taking into account the obtained data, spontaneous contamination was treated in a long-cultivated strain of the H1299 line. Artificial infection of the studied cell lines with the identified contaminant followed by treatment according to a similar scheme confirmed the adequacy of using ciprofloxacin for decontamination of various adherent cultures in laboratory practice.

Keywords: contamination; ciprofloxacin; H1299; U2OS; HEK293; HCT116; mycoplasma.

For citation: Grigoreva T. A., Pozharskii A. A., Grigorev Ya. A., Kindt D. N., Novikova D. S. Optimization of the scheme for decontaminating continuous human cell cultures with antibiotics of different mechanisms. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 16–24. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-16-24>. EDN: OEYZZZ. (in Russian)

Введение

Контаминация клеточных линий — важная, но часто игнорируемая проблема при использовании клеточных культур в исследованиях или производстве. Из возможных видов клеточного загрязнения наиболее опасно заражение биологическими объектами, последствия которого непредсказуемы.

Загрязнители с высокими темпами размножения — дрожжи, бактерии — опасны чрезмерным потреблением питательных веществ и наполнением среды вредными метаболитами. В случае же развития малозаметной контаминации, такой как микоплазменная, последствия могут быть более разнообразными и менее очевидными, чем гибель используемых клеток.

Микоплазма, являясь внутриклеточным паразитом, может долгое время оставаться незамеченной, значительно влияя при этом на заражённую культуру. В данном случае исследователи будут получать недостоверные данные: присутствие контаминанта способно инициировать каскад метаболических процессов, уникальный для каждой системы «клеточная линия — загрязнитель». Чем дольше загрязнение игнорируется, тем сильнее возрастает ущерб для исследований [1].

Важной особенностью биологической контаминации является возможность заражения других клеточных линий. Риск загрязнения клеток значительно увеличивается при длительном культивировании. Таким образом, во избежание негативных последствий возникновения загрязнения исследователям необходимо тщательно соблюдать правила асептической работы с клетками, а также иметь эффективные методы устранения загрязнения.

Наиболее частыми источниками контаминации являются бактерии, дрожжи и грибы, включая *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus felis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.* [2]. Реже возможно заражение культуры вирусами или простейшими.

Для устранения загрязнения в лабораторной практике рекомендуется использовать следующие препараты: пенициллин–стрептомицин, ген-

тамицин, стрептомицин, канамицин, неомицин, полимиксин В, амфотерицин В, нистатин [2]. Однако использование деконтаминирующих препаратов может также оказывать негативное влияние на клеточную линию: влиять на метаболизм и пролиферацию, нарушать проницаемость клеточной мембраны [3] и приводить, в том числе, к полной гибели клеток.

Цель работы — изучение влияния используемых для деконтаминации препаратов на адгезивные человеческие клеточные культуры и эффективности их применения.

Материал и методы

Клеточные линии аденокарциномы лёгкого H1299, остеосаркомы U2OS и линия HEK293, полученные из эмбриональных почек человека, предоставлены ФГБУН «Институт цитологии РАН» (Санкт-Петербург, Россия), клетки колоректальной карциномы HCT116 — АО «БИОКАД», Санкт-Петербург, Россия.

Использовали реактивы производства Invitrogen Corporation (Carlsbad, California, USA) — Hoechst 33342; ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, USA) — питательные среды DMEM, 0,25% раствор трипсина в ЭДТА; ООО «БиолоТ» — пенициллин/стрептомицин, гентамицин, амфотерицин В, ципрофлоксацин, L-глутамин.

Клетки культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 mM L-глутамин при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Пересев клеток осуществляли каждые 3 дня с использованием 0,25% трипсина.

При изучении токсического эффекта антибиотиков клетки культивировали аналогично в присутствии препаратов на протяжении двух недель. Параллельно осуществляли пересевы контрольных образцов клеточных линий без препаратов, для количественной оценки наблюдаемых эффектов за 100% принимали количество клеток контрольного образца в соответствующие сутки, оценивая по пять полей в каждом образце.

Заражение культур осуществляли путём переноса питательной среды от контаминированных клеток к здоровым после фильтрации (фильтр 0,4 мкм). При пересевах таких образцов каждые 3 дня клетки центрифугировали в течение 5 мин при скорости 800 об/мин. Для оценки долговременного эффекта препаратов клетки после 2 нед. обработки переносили в DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и 2 mM L-глутамин без каких-либо антибиотиков.

Оптическую микроскопию при увеличении ×200 и ×400 (микроскоп Olympus CKX41, камера Olympus SC30, программное обеспечение Olympus analySIS FIVE) применяли для ежедневного контроля состояния культур и оценки их конфлюэнтности.

Для детекции ДНК контаминанта внутри клеток использовали флуоресцентную микроскопию с покраской Hoechst 33342 [4]. Для этого клетки обрабатывали раствором красителя в концентрации 8 мкМ на протяжении 20 мин в

темноте. Затем краситель удаляли, и клетки в питательной среде визуализировали при помощи системы высокосо­держательного анализа Operetta CLS™ (фильтры: brightfield (excit./emmis. — transmission/650–760 нм), Hoechst 33342 (excit./emmis. — 360–400 нм/410–480 нм)) [5–7].

Результаты и обсуждение

При длительном культивировании часто возникает необходимость использовать антибиотические препараты для поддержания чистоты клеточной культуры. К сожалению, в настоящее время не существует единого протокола лечения заражённых клеток в лабораторной практике, однако можно найти информацию о наиболее широко применяемых антибиотических препаратах и их рекомендуемых концентрациях. Для исследования воздействия антибиотиков различных групп на эукариотические клетки мы выбрали ряд общедоступных препаратов, чаще всего используемых при культивировании: пенициллин/стрептомицин, гентамицин, амфотерицин В, ципрофлоксацин, генетицин. В табл. 1 приведены сведения об их механизме действия и рекомендуемые диапазоны концентраций согласно данным литературы.

Исследование проводили на четырёх адгезивных клеточных линиях: H1299 (немелкоклеточная карцинома лёгкого человека), актуальная для исследований функционирования АМФ-активируемой протеинкиназы [15], HCT116 (карцинома тол-

стой кишки человека), активно используемая для изучения процессов р53-опосредованного апоптоза [16], U2OS (остеосаркома человека), модельная культура для исследования ингибирования MDM2 [17], а также HEK293 (клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека). В качестве контроля использовали культуры, культивируемые в среде без антибиотика, их кон­флюэнтность каждый раз принимали за 100%. Оценка эффекта препаратов производилась с помощью микроскопирования в ходе культивирования клеток в присутствии различных концентраций соединений на протяжении 2 нед.

В первую очередь эксперименты проводили на клетках немелкоклеточной карциномы лёгкого человека. Диапазоны концентраций выбирались на основе данных, представленных в табл. 1. Исследование влияния генетина в концентрациях, существенно превышающих представленные значения, было обусловлено тем, что данный антибиотик широко используется для селекции при трансфекции плазмидного генетического материала [18].

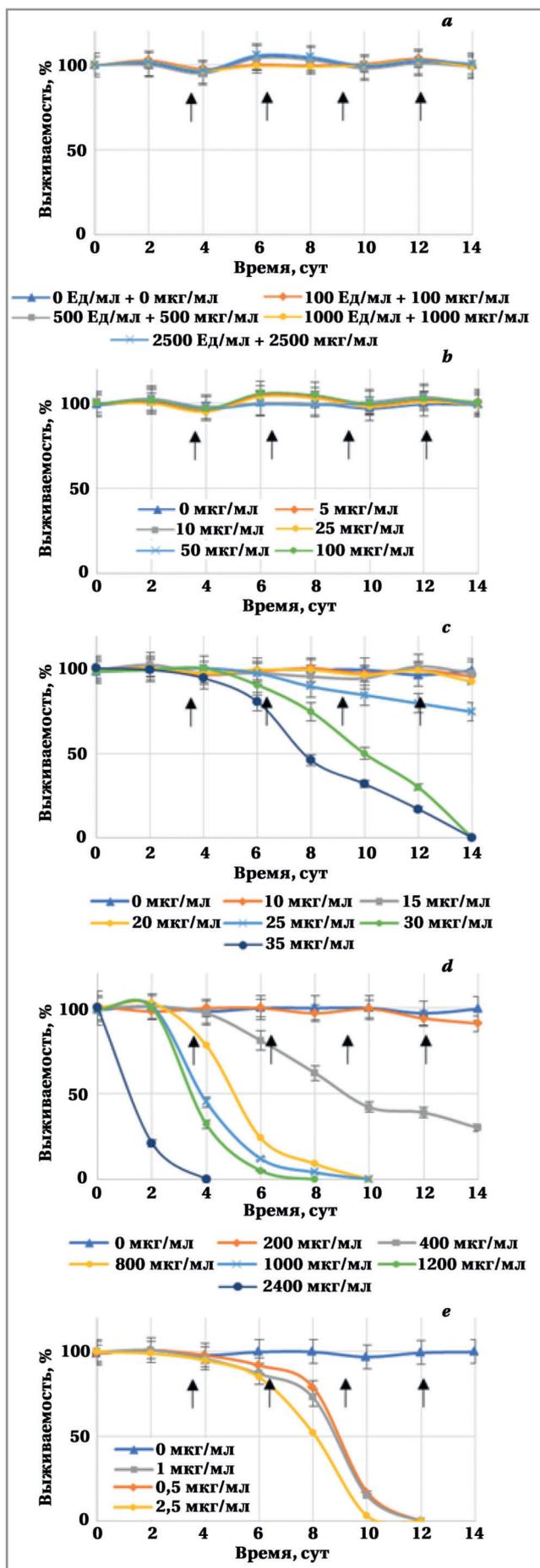
Было показано, что рекомендуемые концентрации антибиотиков безопасны для клеток линии H1299, за исключением амфотерицина В. Данный препарат антимикотического действия даже в концентрации 0,5 мкг/мл оказывает влияние на жизнедеятельность клеток (рис. 1).

Таблица 1. Характеристика использованных препаратов
Table 1. Characteristics of the drugs used

Препарат	Класс антибиотика	Чувствительные микроорганизмы	Механизм действия	Рекомендуемая эффективная концентрация	Источник литературы
Пенициллин	Бета-лактамы	Бактерии	Подавление синтеза компонентов клеточной стенки	50–100 Ед/мл	[2, 3, 8]
Стрептомицин	Аминогликозид I поколения	Бактерии	Подавление синтеза белка за счёт связывания с 30S субъединицей рибосомы	50–100 мкг/мл	[2, 3, 9, 10]
Гентамицин	Аминогликозид II поколения	Бактерии	Подавление синтеза белка за счёт связывания с 30S субъединицей рибосомы	5–50 мкг/мл	[2, 9, 10]
Генетицин	Аминогликозид	Прокариоты и эукариоты	Подавление синтеза белка за счёт связывания рибосомой	200 мкг/мл*	[11]
Ципрофлоксацин	Фторхинолон II поколения	Бактерии, простейшие	Нарушение репликации ДНК	≥10 мкг/мл	[12]
Амфотерицин В	Макроциклический полиеновый антибиотик	Микромицеты	Лизис за счёт взаимодействия со стеролами клеточной мембраны	0,5–2,5 мкг/мл	[2, 13, 14]

Примечание. * — представлена концентрация, безопасная для эукариотических клеток по данным [11].

Note. * — the concentration shown is safe for eukaryotic cells according to [11].



Также была проведена оценка влияния выбранных концентраций исследуемых препаратов на клеточные линии НСТ116, U2OS и НЕК293. Аминогликозиды в рекомендуемых концентрациях оказались безопасны для рассматриваемых культур. Даже в сочетании с пенициллином они не оказывали заметного влияния на рост и морфологию клеток. Генетицин в высоких концентрациях также проявлял токсический эффект уже на 4-е сутки, однако в концентрации 200 мкг/мл не оказал пагубного влияния на рост и морфологию клеток на протяжении всего периода испытаний.

Известно, что фторхинолоны оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки [19], тем не менее, в ходе нашего исследования токсический эффект ципрофлоксацина был отмечен лишь спустя неделю непрерывной обработки при превышении концентрации 25 мкг/мл на всех рассмотренных клеточных линиях. В случае амфотерицина В исследуемые клетки выдерживали концентрации, рекомендуемые для подавления микромицетов, на протяжении недели, однако при увеличении срока обработки препарат оказывал на них сильное токсическое действие. При этом наиболее чувствительными к этому препарату оказались клетки линии НСТ116. На рис. 2 приведена выживаемость клеток линий НСТ116, U2OS и НЕК293 при культивировании в присутствии препаратов в максимальных используемых концентрациях (в случае безопасных для Н1299 пенициллина/стрептомицина, гентамицина), в концентрациях, при которых наблюдается негативный эффект (ципрофлоксацин, генетицин, амфотерицин В).

Таким образом, можно утверждать, что использование любого из рассмотренных препаратов в рекомендуемых концентрациях в течение недели является безопасным для изучаемых клеточных линий, однако в случае заражений, требующих долгосрочного лечения, необходимо учитывать риски развития токсических эффектов.

Рис. 1. Выживаемость клеток линии Н1299 при культивировании в присутствии препаратов: *a* — пенициллин/стрептомицин; *b* — гентамицин; *c* — ципрофлоксацин; *d* — генетицин; *e* — амфотерицин В. **Примечание.** Здесь и в табл. 2. За 100% принята конfluence контрольного образца в день измерения, в каждом образце исследовали по 5 полей при увеличении $\times 200$, стрелками показаны дни пересевов.

Fig. 1. Survival of H1299 cells when cultured in the presence of the following drugs: penicillin/streptomycin (*a*), gentamicin (*b*), ciprofloxacin (*c*), amphotericin B (*e*). **Note.** Here and in Table 2. The confluence of the control sample on the day of measurement was taken as 100%, 5 fields were examined in each sample at a magnification of $\times 200$, the arrows indicate the days of reseedings.

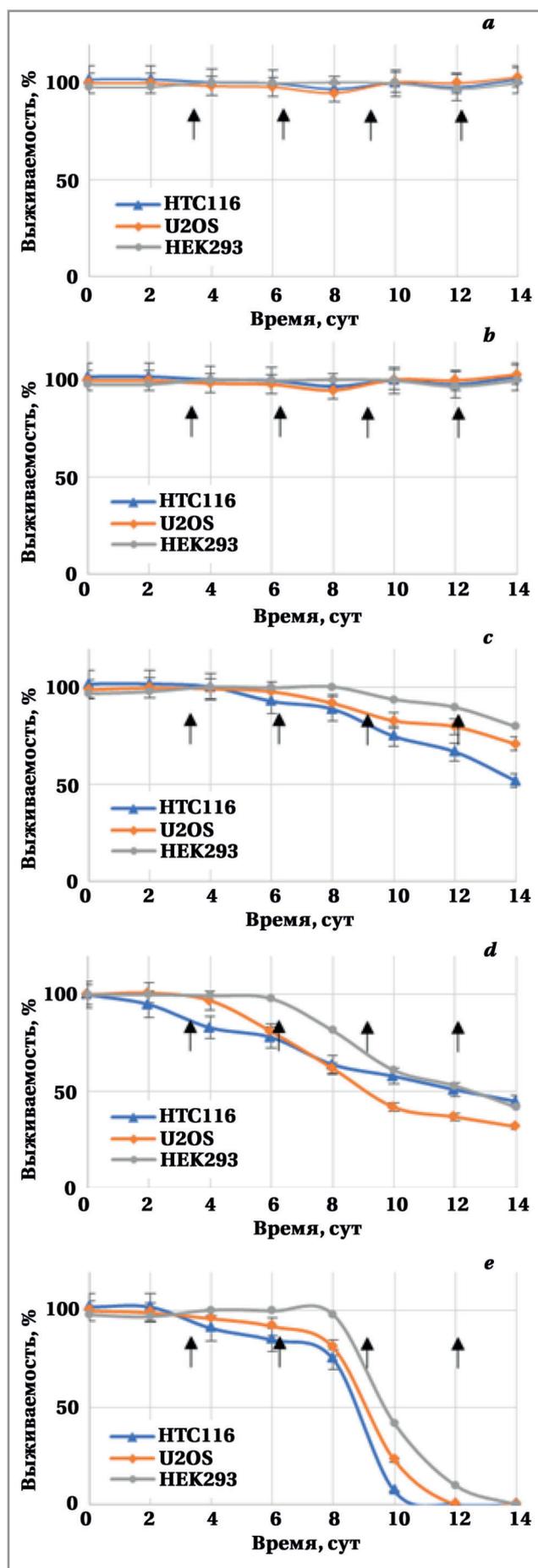
На следующем этапе исследования мы провели оценку возможности использования рассматриваемых препаратов для восстановления чистоты заведомо контаминированной клеточной культуры. В нашем распоряжении оказалась линия Н1299, проявлявшая типичные признаки контаминации. Характер первичного заражения клеток Н1299 позволил предположить, что контаминант является представителем рода *Mycoplasma*, что впоследствии было подтверждено с использованием коммерчески доступного ПЦР набора. Отмечается, что у клеток, заражённых микоплазмой, изменяется скорость пролиферации, нарушается метаболизм, в некоторых случаях наблюдается вакуолизация и зернистость клеток, возможно образование многоядерных клеток [20].

В лабораторной практике зачастую не тратят время на выяснение типа контаминанта, а незамедлительно начинают проводить обработку антибиотическими агентами. Однако необходимым этапом работы является определение локализации и объёма контаминации, а также его влияния на клеточную культуру. В процессе культивирования загрязнённого штамма мы отметили ослабление адгезивных свойств клеток и замедление их пролиферации. Среда, используемая при культивировании, быстро закислялась, что характерно для микоплазменной инфекции. Мы также провели окрашивание клеток флуоресцентным ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342 [21] и проанализировали полученные результаты с помощью системы высокосолевого анализа Opreta, используя чистую культуру клеток Н1299 для сравнения. На снимках чистой клеточной культуры (рис. 3, *a*) детектируется только флуоресценция ядерной ДНК, в то время как на снимках заражённых клеток Н1299 помимо флуоресценции ядер можно различить границу цитоплазмы (рис. 3, *b*), что подтверждает присутствие и локализацию контаминанта.

Предполагая, что нам достоверно не известен контаминант, мы провели оценку воздействия всех рассматриваемых классов препаратов на клетки Н1299. Заражённую культуру культивировали с препаратами в течение 14 дней, лишь

Рис. 2. Выживаемость клеток линий НТС116, U2OS и НЕК293 при культивировании в присутствии препаратов: *a* — пенициллин/стрептомицин 2500 Ед/мл + 2500 мкг/мл; *b* — гентамицин 100 мкг/мл; *c* — ципрофлоксацин 25 мкг/мл; *d* — генетицин 400 мкг/мл; *e* — амфотерицин В 0,5 мкг/мл.

Fig. 2. Survival of НТС116, U2OS and НЕК293 cell lines when cultured in the presence of the following drugs: penicillin/streptomycin 2500 U/ml + 2500 µg/ml (*a*), gentamicin 100 µg/ml (*b*), ciprofloxacin 25 µg/ml (*c*), geneticin 400 µg/ml (*d*), amphotericin B 0.5 µg/ml (*e*).



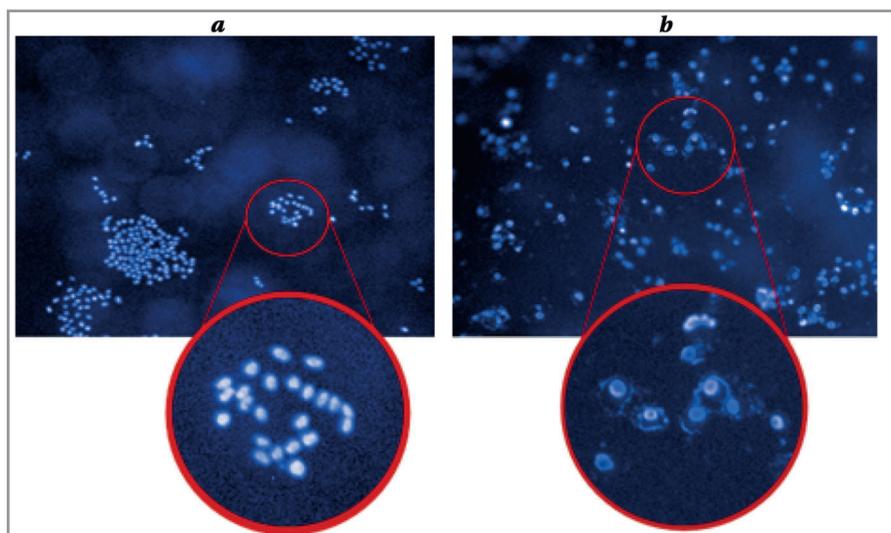


Рис. 3. Окраска клеток линии H1299 флуоресцентным ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342.

Примечание. *a* — здоровая клеточная линия; *b* — заражённая клеточная линия. Увеличение $\times 10$.

Fig. 3. Staining of H1299 cells with the fluorescent DNA-binding dye Hoechst 33342: healthy cell line (*a*), infected cell line (*b*).

Note. $\times 10$ magnification.

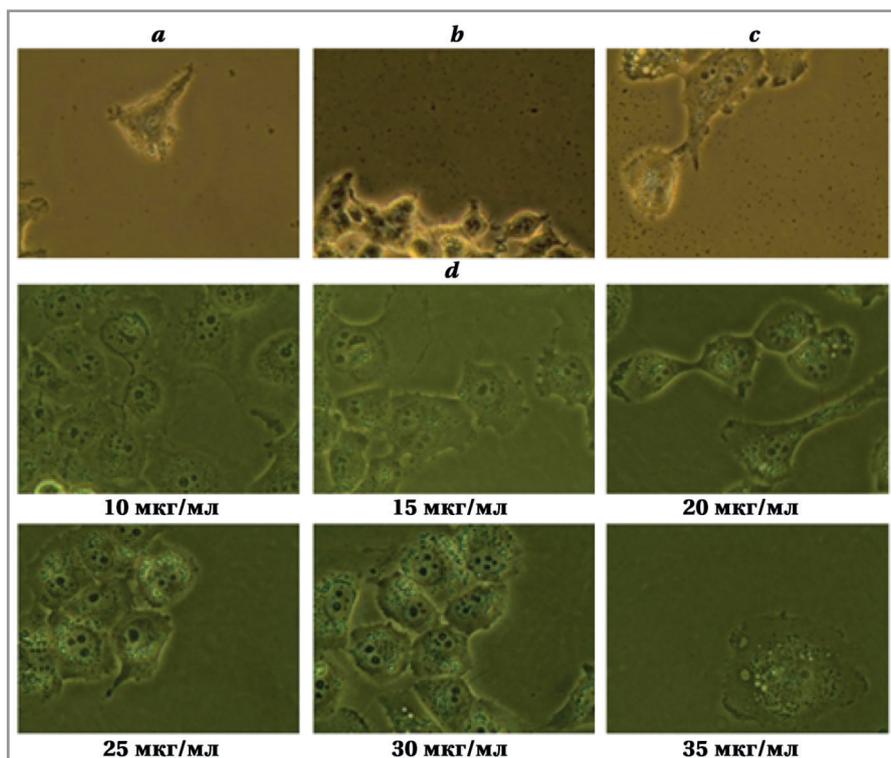


Рис. 4. Влияние исследуемых препаратов на клетки H1299 и контаминацию по данным оптической микроскопии.

Примечание. *a* — амфотерицин В 2,5 мкг/мл, 8 сут; *b* — пенициллин/стрептомицин 2500 Ед/мл + 2500 мкг/мл, 14 сут; *c* — гентамицин 100 мкг/мл, 14 сут; *d* — ципрофлоксацин, 14 сут. Увеличение $\times 400$.

Fig. 4. The effect of the studied drugs on H1299 cells and contamination according to optical microscopy data.

Note. *a* — amphotericin B 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, day 8; *b* — penicillin/streptomycin 2500 U/ml + 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, day 14; *c* — gentamicin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, day 14; *d* — ciprofloxacin, day 14. $\times 400$ magnification.

для амфотерицина В длительность обработки ограничивалась 7 сут. Ожидается, антимикотик амфотерицин В не оказал терапевтического эффекта даже при использовании токсичных для клеток концентраций препарата — количество контаминанта в межклеточном пространстве снижалось соответственно количеству выживших клеток (рис. 4, *a*).

Аналогично, сочетание пенициллин–стрептомицин оказалось неэффективным для борьбы с контаминантом во всём достижимом диапазоне концентраций (рис. 4, *b*). Данные результаты объясняются тем фактом, что у представителей класса *Mollicutes* отсутствует клеточная стенка, определяющая механизм действия бета-лактамов и амфотерицина В [22]. Отсутствовал эффект и в случае гентамицина (рис. 4, *c*), что согласуется с данными литературы о вариабельности чувствительности микоплазм к этому препарату [23]. Различий во влиянии препаратов на рост заражённых клеток по сравнению со здоровыми также не было отмечено, в отличие от пагубного влияния контаминанта.

Наиболее популярной группой препаратов, используемых для подавления микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур, являются фторхинолоны. В частности, применение цiproфлоксацина рекомендуется, в том числе, при иммунодефицитных состояниях и сочетанных инфекциях [22]. При обработке заражённой клеточной культуры H1299 использовали тот же диапазон концентраций, что и в случае здоровых клеток: 10, 15, 20, 25, 30, 35 мкг/мл. Было подтверждено отсутствие токсического действия цiproфлоксацина на клетки H1299 в concentra-

циях 10–20 мкг/мл, слабо выраженное антипролиферативное и цитотоксическое действие в концентрации 25 мкг/мл и значительное токсическое воздействие препарата в концентрациях 30–35 мкг/мл, приводящее к гибели клеток через 14 дней культивирования (рис. 4, *d*). При этом все рассмотренные концентрации, включая 10 мкг/мл ципрофлоксацина, вызывали объективное снижение контаминации.

Чтобы оценить эффективность применения ципрофлоксацина для деконтаминации клеток в лабораторных условиях, жизнеспособные после двухнедельной обработки препаратом клетки H1299 культивировали в питательной среде DMEM без добавления каких-либо антибиотиков в течение следующих 2 нед. После этого оценивали наличие и объёмы загрязнения с помощью оптической и флуоресцентной микроскопии (табл. 2). В случае клеток, которые были обработаны 10 мкг/мл ципрофлоксацина, наблюдалось возобновление контаминации как внутри клеток, так и в межклеточном пространстве. Концентрации 15–25 мкг/мл не только оказались безопасны для клеток H1299, но и продемонстрировали стабильный антибиотический эффект. Дальнейшее культивирование не привело к повторному выявлению контаминанта, в то же время наблюдалось отсутствие признаков закисления среды и восстановление скорости пролиферации клеток.

Для оценки применимости подхода для других клеточных культур, заражённую питательную среду клеток H1299 добавляли к здоровым клеткам HCT116, U2OS и HEK293. Обработку ципрофлоксацином начинали после появления признаков заражения, при этом использовали тот же

диапазон концентраций, что и в случае клеток H1299. Результаты экспериментов по деконтаминации первично заражённой линии H1299 и вторично заражённых линий HCT116, U2OS и HEK293 сведены в табл. 2.

Согласно полученным данным, обработка ципрофлоксацином оказалась наиболее эффективной в случае клеточной линии HCT116. При обработке линий U2OS и HEK293 долгосрочного эффекта удалось добиться только при использовании повышенных концентраций ципрофлоксацина, которые оказывают негативное влияние и на сами клетки, причём в случае линии остеосаркомы удовлетворительный эффект был достигнут после повышения концентрации препарата до 40 мкг/мл. Вероятно, такое различие в требуемых концентрациях связано с особенностями клеток, которые выступают в роли резервуаров, сохраняющих контаминант.

Таким образом, оптимальной концентрацией для первичной обработки клеточной культуры стоит считать диапазон 20–35 мкг/мл ципрофлоксацина в условиях постоянного контроля с изменением концентрации препарата в зависимости от проявляющихся эффектов.

Заключение

В результате исследования установлено, что пенициллин/стрептомицин (до 2500 Ед/мл и 2500 мкг/мл, соответственно), гентамицин (до 100 мкг/мл), ципрофлоксацин (до 25 мкг/мл) и генетицин (до 400 мкг/мл) безопасны для адгезивных человеческих клеточных культур, в то время как амфотерицин В вызывает гибель кле-

Таблица 2. Наличие признаков контаминации при обработке клеточных линий ципрофлоксацином
Table 2. Signs of contamination during treatment of cell lines with ciprofloxacin

Концентрация ципрофлоксацина, мкг/мл	Условия	Клеточные линии			
		H1299	HCT116	U2OS	HEK293
10	14 сут ципрофлоксацин	—	—	+	+
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	+	+	+	+
15	14 сут ципрофлоксацин	—	—	+	+
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	—	—	+	+
20	14 сут ципрофлоксацин	—	—	+	+
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	—	—	+	+
25	14 сут ципрофлоксацин	—	—	+	+
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	—	—	+	+
30	14 сут ципрофлоксацин	×	×	—	—
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	Н. о.	Н. о.	+	—
35	14 сут ципрофлоксацин	×	×	—	×
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	Н. о.	Н. о.	+	Н. о.
40	14 сут ципрофлоксацин	Н. о.	Н. о.	—	Н. о.
	14 сут ципрофлоксацин + 14 сут среда	Н. о.	Н. о.	—	Н. о.

Примечание. «+» — соответствует наличию признаков контаминации; «—» — соответствует отсутствию следов контаминации; «×» — означает 100% гибель клеток через 14 сут; «Н. о.» — эксперимент не проводился.

Note. «+» — corresponds to the presence of signs of contamination; «—» — corresponds to the absence of signs of contamination; «×» — means 100% cell death after 14 days; «Н. о.» — the experiment was not conducted.

ток уже в концентрации 0,5 мкг/мл. Культуры клеток человека H1299, HCT116, U2OS и HEK293 эффективно очищаются от микоплазменной контаминации при использовании ципрофлоксацина в концентрациях 20–25 мкг/мл, однако выбор условий обработки должен определяться чувствительностью к препарату конкретной клеточной культуры.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-00296).

Литература/References

1. *Abatenh E., Gizaw B., Tsegaye Z.* Contamination in a microbiological laboratory. *Int J Res Stud Biosci.* 2018; 6 (4): 7–13. doi: <https://doi.org/10.20431/2349-0365.0604002>.
2. *Mahmood A., Ali S.* Microbial and viral contamination of animal and stem cell cultures: common contaminants, detection and elimination. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 2 (5): 149–155. doi: <https://doi.org/10.15406/jstrt.2017.02.00078>.
3. *Dalhoff A.* Selective toxicity of antibacterial agents — still a valid concept or do we miss chances and ignore risks? *Infection.* 2021; 49: 29–56. doi: [10.1007/s15010-020-01536-y](https://doi.org/10.1007/s15010-020-01536-y).
4. *Chazotte B.* Labeling nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011; 2011 (1): pdb.prot5557. doi: [10.1101/pdb.prot5557](https://doi.org/10.1101/pdb.prot5557).
5. *Novikova D. S., Grigoreva T. A., Ivanov G. S., Melino G., Barlev N. A., Tribulovich V.* Activating effect of 3-benzylidene oxindoles on AMPK: from computer simulation to high-content screening. *ChemMedChem.* 2020; 15 (24): 2521–2529. doi: [10.1002/cmdc.202000579](https://doi.org/10.1002/cmdc.202000579).
6. *Grigoreva T., Romanova A., Sagaidak A., Vorona S., Novikova D., Tribulovich V.* Mdm2 inhibitors as a platform for the design of P-glycoprotein inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020; 30 (18): 127424. doi: [10.1016/j.bmcl.2020.127424](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127424).
7. *Grigoreva T., Sagaidak A., Romanova A., Novikova D., Garabadzhiu A., Tribulovich V.* Establishment of drug-resistant cell lines under the treatment with chemicals acting through different mechanisms. *Chem Biol Interact.* 2021; 344: 109510. doi: [10.1016/j.cbi.2021.109510](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109510).
8. *Sharma S. K., Singh L., Singh S.* Comparative study between penicillin and ampicillin. *Sch J App Med Sci.* 2013; 1 (4): 291–294. doi: <https://doi.org/10.36347/sjams.2013.v01i04.019>.
9. *Kornder J. D.* Streptomycin revisited: molecular action in the microbial cell. *Med Hypotheses.* 2002; 58 (1): 34–46. doi: <https://doi.org/10.1054/mehy.2001.1450>.
10. *Jospe-Kaufman M., Siomin L., Fridman M.* The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020; 30 (13): 127218. doi: [10.1016/j.bmcl.2020.127218](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127218).
11. *Birk A. V., Dubovi E. J., Zhang X., Szeto H. H.* Antiviral activity of geneticin against bovine viral diarrhoea virus. *Antivir Chem Chemother.* 2008; 19 (1): 33–40. doi: [10.1177/095632020801900105](https://doi.org/10.1177/095632020801900105).
12. *Zhang G., Liu X., Zhang S., Pan B., Liu M.* Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem.* 2018; 146: 599–612. doi: [10.1016/j.ejmech.2018.01.078](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.078).
13. *Colozza C., Posteraro B., Santilli S., De Carolis E., Sanguinetti M. A., Girmenia C.* *In vitro* activities of amphotericin B and ambisome against *Aspergillus* isolates recovered from Italian patients treated for haematological malignancies. *J Antimicrob Agents.* 2012; 39: 440–443. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2012.01.013](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.013).
14. *Дмитриева Н. В., Петухова И. Н.* Сравнительная эффективность и переносимость липидного комплекса амфотерицина В и липосомального амфотерицина В при лечении инвазивных грибковых инфекций у онкогематологических больных: обзор литературы. *Онкогематология.* 2014; 9 (1): 35–41. doi: doi.org/10.17650/1818-8346-2014-9-1-35-41. [*Dmitrieva N. V., Petukhova I. N.* Comparative efficacy and tolerability of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: literature review. *Oncohematology.* 2014; 9 (1): 35–41. doi: doi.org/10.17650/1818-8346-2014-9-1-35-41. (in Russian)]
15. *Novikova D. S., Grigoreva T. A., Zolotarev A. A., Garabadzhiu A. V., Tribulovich V. G.* Advanced palladium free approach to the synthesis of substituted alkene oxindoles via aluminum-promoted Knoevenagel reaction. *RSC Adv.* 2018; 60 (8): 34543–34551. doi: [10.1039/c8ra07576j](https://doi.org/10.1039/c8ra07576j).
16. *Grigoreva T. A., Novikova D. S., Gureev M. A., Garabadzhiu A. V., Tribulovich V. G.* Amino acids as chiral derivatizing agents for antiproliferative substituted N-benzyl isoindolinones. *Chirality.* 2018; 30 (6): 785–797. doi: [10.1002/chir.22854](https://doi.org/10.1002/chir.22854).
17. *Gureev M., Novikova D., Grigoreva T., Vorona S., Garabadzhiu A., Tribulovich V.* Simulation of MDM2 N-terminal domain conformational lability in the presence of imidazoline based inhibitors of MDM2-p53 protein-protein interaction. *J Comput Aided Mol Des.* 2020; 34: 55–70. doi: [10.1007/s10822-019-00260-6](https://doi.org/10.1007/s10822-019-00260-6).
18. *Arshad H., Patel Z., Mehrabian M., Bourkas M. E. C., Al-Azzawi Z. A. M., Schmitt-Ulms G., Watts J. C.* The aminoglycoside G418 hinders de novo prion infection in cultured cells. *J Biol Chem.* 2021; 297 (3): 101073. doi: [10.1016/j.jbc.2021.101073](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101073).
19. *Yadav V., Talwar P.* Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth. *Biomed Pharmacother.* 2019; 111: 934–946. doi: [10.1016/j.biopha.2018.12.119](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.119).
20. *Шалунова Н. В., Волкова Р. А., Волгин А. Р., Петручук Е. М., Бердникова З. Е., Эльберт Е. В., и др.* Микоплазмы — контаминанты клеточных культур. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2016; 16 (3): 151–160. [*Shalunova N. V., Volkova R. A., Volgin A. R., Petruchuk E. M., Berdnikova Z. E., Elbert E. V. et al.* Mycoplasma — contamination of cell cultures. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2016; 16 (3): 151–160. (in Russian)]
21. *Greenfield E. A.* Testing hybridoma cells for Mycoplasma contamination. *Cold Spring Harb Protoc.* 2021; 2021 (7). doi: [10.1101/pdb.prot103283](https://doi.org/10.1101/pdb.prot103283).
22. *Чернова О. А., Медведова Е. С., Музыкантов А. А., Баранова Н. Б., Чернов В. М.* Микоплазмы и их устойчивость к антибиотикам: проблемы и перспективы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур. *Acta Naturae.* 2016; 8 (2): 24–34. doi: <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-2-24-34>. [*Chernova O. A., Medvedeva E. S., Mouzykantov A. A., Baranova N. B., Chernov V. M.* Mycoplasmas and their antibiotic resistance: The problems and prospects in controlling infections. *Acta Naturae.* 2016; 8 (2): 24–34. doi: <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-2-24-34>. (in Russian)]
23. *Хилькевич Н. Д.* К вопросу о генитальных микоплазменных инфекциях. *Военная медицина.* 2012; 2: 128–133. [*Khilkevich N. D.* K voprosu o genital'nykh mikoplazmennykh infektsiyakh. *Voennaya meditsina.* 2012; 2: 128–133. (in Russian)]

Поступила / Received 15.03.2023
Принята в печать / Accepted 28.04.2023

Информация об авторах

Григорьева Татьяна Алексеевна — к.х.н., старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-1271-0328

Пожарский Артур Айварович — студент НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия

Григорьев Ярослав Александрович — студент НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия

Киндт Дарья Николаевна — студент НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0181-4968

Новикова Дарья Сергеевна — к.х.н., старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5310-4570

About the authors

Tatyana A. Grigoreva — Ph. D. in Chemistry, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-1271-0328

Artur A. Pozharskii — Student, Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia.

Yaroslav A. Grigorev — Student, Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia.

Daria N. Kindt — Student, Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0181-4968

Daria S. Novikova — Ph. D. in Chemistry, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Pharmacology, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5310-4570

Оценка противовирусной активности полимерных электролитов, инкапсулированных в микронный кальций карбонат, в отношении респираторно-синцитиального вируса

А. М. КЛАБУКОВ¹, *Д. Н. РАЗГУЛЯЕВА¹, Н. А. НЕСТЕРОВА², Ю. А. ТИЩЕНКО³,
Д. Р. АХМЕТОВА^{3,4}, Н. В. ГАВРИЛОВА^{1,3}, С. А. ШИПИЛОВСКИХ^{3,4},
А. А. ШТРО¹, Е. Ф. ПАНАРИН²

¹ ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Институт высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН), Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, Россия

⁴ Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. Респираторно-синцитиальный вирус широко распространён в популяции и представляет серьёзную опасность для людей, находящихся в группе риска. Среди них можно назвать младенцев, пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом. Несмотря на то, что недавно были одобрены вакцины против респираторно-синцитиального вируса для беременных женщин и людей преклонного возраста, повсеместно одобренного препарата для эффективной этиотропной терапии всё ещё не существует. **Цель.** Оценка противовирусной активности трёх производных полимерных электролитов, показавших эффективность в отношении широкого спектра вирусов на предыдущих этапах работы, при инкапсуляции их в микрочастицы карбоната кальция. **Методы.** Инкапсуляция полимерных электролитов проводилась методом абсорбции и методом соосаждения. Эффективность инкапсуляции оценивалась методом спектрометрии. Для исследования размеров и морфологии полученных носителей и инкапсулированных препаратов полимерных электролитов был использован просвечивающий электронный микроскоп. Для исследования коллоидной стабильности полученных носителей и инкапсулированных препаратов полимерных электролитов был использован метод динамического светорассеяния. Оценка цитотоксичности соединений проводилась на культуре клеток HEp-2 при помощи МТТ-теста. Детекцию вируса при измерении противовирусной активности соединений осуществляли при помощи иммуноферментного анализа (cell-ELISA). **Результаты.** По результатам спектрофотометрического исследования наиболее эффективным способом включения соединений в носители оказалась методика соосаждения. При добавлении полимерных соединений в микрочастицы CaCO₃ носители сохраняют первоначальный размер и структуру. Изучение противовирусной активности соединений показало, что инкапсуляция может способствовать снижению их цитотоксичности с сохранением противовирусных свойств. **Заключение.** Таким образом, дальнейшие исследования данной группы веществ и способов их доставки являются перспективными для создания эффективного и безопасного противовирусного препарата широкого спектра действия.

Ключевые слова: полимерные электролиты; противовирусная активность; респираторно-синцитиальный вирус

Для цитирования: Клабуков А. М., Разгуляева Д. Н., Нестерова Н. А., Тищенко Ю. А., Ахметова Д. Р., Гаврилова Н. В., Шипиловских С. А., Штро А. А., Панарин Е. Ф. Оценка противовирусной активности полимерных электролитов, инкапсулированных в микронный кальций карбонат, в отношении респираторно-синцитиального вируса. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 25–31. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-25-31>. EDN: CGHDGF

Evaluation of Antiviral Activity of Polymer Electrolytes Encapsulated in Micron Calcium Carbonate Against Respiratory Syncytial Virus

ARTEM M. KLABUKOV¹, *DARYA N. RAZGULYAEVA¹, NATALYA A. NESTEROVA²,
YULIYA A. TISHCHENKO³, DARYA R. AKHMETOVA^{3,4}, NINA V. GAVRILOVA^{1,3},
SERGEI A. SHIPILOVSKIKH^{3,4}, ANNA A. SHTRO¹, EVGENIY F. PANARIN²

¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

² Institute of Macromolecular Compounds, Branch of the Petersburg Nuclear Physics Institute Named by B. P. Konstantinov of the National Research Centre «Kurchatov Institute», St. Petersburg, Russia

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: drazgulyaeva@bk.ru



*Correspondence to:
E-mail: drazgulyaeva@bk.ru

EDN: CGHDGF



Abstract

Background. Respiratory syncytial virus is widespread in the population and poses a serious danger to people at risk. Among them are infants, the elderly, and people with weakened immune systems. Despite the fact that respiratory syncytial virus vaccines have recently been approved for pregnant women and the elderly, there is still no universally approved drug for effective etiotropic therapy. **The aim of the study** was to evaluate the antiviral activity of three polymer electrolyte derivatives, which showed effectiveness against a wide range of viruses at previous stages of work, upon encapsulation in calcium carbonate microparticles. **Methods.** The encapsulation of polymer electrolytes was carried out by the absorption method and the coprecipitation method. The encapsulation efficiency was evaluated by spectrometry. A transmission electron microscope was used to study the size and morphology of the obtained carriers and encapsulated preparations of polymer electrolytes. The dynamic light scattering method was used to study the colloidal stability of the obtained carriers and encapsulated specimens of polymer electrolytes. The cytotoxicity of the compounds was evaluated on HEp-2 cell culture using an MTT assay. Virus detection when measuring the antiviral activity of compounds was carried out using enzyme immunoassay (cell-ELISA). **Results.** The results of spectrophotometry led to the conclusion that the method of coprecipitation is the most effective way to incorporate compounds into carriers. When polymer compounds are added to CaCO₃ microparticles, the carriers retain their original size and structure. The study of the antiviral activity of the compounds showed that encapsulation can help reduce their cytotoxicity while maintaining antiviral properties. **Conclusion.** Thus, further studies of this group of substances and their delivery methods are promising for the creation of an effective and safe broad-spectrum antiviral drug.

Keywords: respiratory syncytial virus, polymeric compounds, antiviral activity, encapsulation, microsized calcium carbonate particles

For citation: Klabukov A. M., Razgulyaeva D. N., Nesterova N. A., Tishchenko Yu. A., Akhmetova D. R., Gavrilova N. V., Shipilovskikh S. A., Shtro A. A., Panarin E. F. Evaluation of antiviral activity of polymer electrolytes encapsulated in micron calcium carbonate against respiratory syncytial virus. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 25–31. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-25-31>. EDN: CGHDGE (in Russian)

Введение

Современная система здравоохранения постоянно принимает меры с целью защиты населения как от повсеместно распространённых, так и неизвестных инфекционных заболеваний. Возникновение и распространение вирусных инфекций в настоящее время происходит практически без контроля из-за процессов глобализации, массового распространения авиаперевозок и сосредоточения населения в крупных мегаполисах [1]. Тем не менее, несмотря на усилия медицинского сообщества, угроза вирусных инфекций, варьирующихся по тяжести и распространённости, сохраняется. Такие события, как пандемия SARS-CoV-2, подтверждают, что вирусные инфекции продолжают представлять опасность для жизни людей по всему миру [2].

Передающиеся воздушно-капельным путём респираторные заболевания вызываются одной из самых распространённых групп вирусов. Основная опасность данных вирусов — быстрый способ передачи от человека к человеку. К этой группе относятся грипп [3], риновирусная [4], коронавирусная, респираторно-синцитиальная вирусная [5], аденовирусная и парагриппозная [6], а также метапневмовирусная инфекции [7]. Большая часть данных вирусов вызывает регулярные эпидемии в холодное время года, которые могут перерасти в пандемии, захватывающие весь земной шар.

Высокая скорость размножения и наличие постоянных мутационных процессов вирусов приводит к возникновению широкого разнообразия вариантов и штаммов, имеющих конкурентное преимущество в определённых обстоятельствах.

Это приводит к вероятности возникновения штаммов с повышенной вирулентностью, которые могут послужить причиной возникновения пандемий. Также важно помнить, что появление резистентных штаммов к существующим химиопрепаратам практически неизбежно при их широком применении.

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) — широко распространённый возбудитель острых респираторных инфекций, поражающий преимущественно детей младшего возраста (до двух лет), но также представляющий значительную угрозу для пожилых людей и лиц с ослабленным иммунитетом [8].

Существует несколько подходов для борьбы с респираторными вирусными инфекциями (в частности, РСВ). Кроме вакцинации, наиболее активно применяется поддерживающее лечение, направленное на облегчение симптомов заболевания и общую поддержку организма. Другим подходом является этиотропная терапия, где основная цель препаратов — подействовать на причину заболевания, непосредственно на вирус. Противовирусные препараты делятся на несколько классов, в зависимости от белковой мишени и вируса, на который они действуют. Например, ингибитор нейраминидазы осельтамивир блокирует проникновение вириона через мембрану и почкование с ней [9]. Также широко распространены препараты, относящиеся к классу нуклеозидных аналогов, например, препарат широкого спектра действия рибавирин [10], который назначают при тяжёлых случаях заболевания РСВ, однако его применение сопряжено с тяжёлыми последствиями для организма.

Наибольший интерес для исследователей представляют препараты широкого спектра действия, ввиду универсальности и простоты применения на практике. Одним из вариантов получения противовирусного препарата широкого спектра действия можно назвать использование водорастворимых полиэлектролитов, которые позволяют синтезировать на их основе полимеры заданной молекулярной массы и архитектуры с широкой вариацией функциональных групп. Строение полимеров позволяет блокировать связывание между поверхностными рецепторами вируса и клетки.

В одном из исследований было описано использование метоксиполиэтиленгликоля (МРЕГ) в качестве противовирусного агента в отношении РСВ. МРЕГ-модификация либо РСВ, либо клетки-хозяина является высокоэффективной профилактической стратегией для предотвращения вирусной инфекции [11].

В нашей предыдущей работе было показано, что модификация полистиролсульфоната натрия путём введения в его структуру звеньев другого строения представляет интерес при изучении влияния химического строения сополимеров на противовирусную активность. Данный подход показал высокую эффективность в предыдущем исследовании [12], где группа производных полистиролсульфоната натрия показала противовирусную активность в отношении широкого спектра вирусов, в том числе РСВ.

В связи с отсутствием эффективных и безопасных средств этиотропной терапии против РСВ разработка новых противовирусных препаратов для борьбы с этим вирусом является актуальным направлением в фармакологии. Такими препаратами могут стать полимеры, обладающие потенциалом для лечения и профилактики вирусных инфекций различной этиологии.

В процессе работы с соединениями встаёт вопрос об их модификации с целью улучшения противовирусных свойств соединений и для уменьшения токсичности. Соединение можно модифицировать добавлением новых функциональных групп, однако альтернативным способом является инкапсуляция препаратов в микроносители. Данный подход позволяет не только повлиять на токсические характеристики молекулы, но и открывает возможность для лучшей доставки лекарственного соединения.

Среди множества видов частиц, применимых в области доставки терапевтических веществ, в данной работе были использованы микрочастицы CaCO_3 . Данный материал является широко изучаемым в сфере наномедицины благодаря своим привлекательным физико-химическим свойствам и сферической морфологии при получении определённой модификации кристаллической структуры.

Цель работы заключалась в создании более эффективных форм доставки препаратов, при помощи инкапсуляции исследуемых веществ в микрочастицы CaCO_3 и исследовании противовирусной активности и цитотоксичности трёх наиболее перспективных сополимеров стирол-сульфоната натрия.

Материал и методы

Исследуемые соединения. В работе использовали три препарата, продемонстрировавшие наиболее широкий спектр противовирусной активности по результатам предыдущих исследований, — R66, R8 и R41. Методика синтеза описана в предыдущей работе [12].

Синтез носителей для инкапсулированной формы препаратов. В качестве носителей исследуемых соединений были синтезированы микроразмерные частицы карбоната кальция (CaCO_3). Для этого 2,5 мл воды Milli-Q, 615 мкл водного раствора CaCl_2 (1 М) и 615 мкл водного раствора Na_2CO_3 (1 М) перемешивали вместе при комнатной температуре в течение 30 с. Полученную суспензию многократно промывали водой Milli-Q и очищали центрифугированием в течение 1 мин при 4000 об/мин после реакции.

Клеточные культуры и вирус. В работе использовалась клеточная культура: HEp-2 (клетки эпидермоидной карциномы гортани человека), полученная из коллекции клеточных культур лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России.

Клеточную культуру рассевали за сутки до исследования на плоскодонные культуральные 96-луночные планшеты в концентрации 3×10^5 клеток/мл. Для культивирования использовалась ростовая среда ДЕМЕМ (Биолот, Россия), содержащая 10% фетальной бычьей сыворотки (Биолот, Россия), а также 20 мкг/мл ципрофлоксацина. Инкубация проводилась при 37°C в присутствии 5% CO_2 .

Использованные вирусы: респираторно-синцитиальный вирус, штамм A2, был получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России.

Инкапсуляция полимерных электролитов и исследование её эффективности. Для получения инкапсулированных препаратов полимерных электролитов были опробованы несколько методов: методика адсорбции и методика соосаждения. Для адсорбции, полученные микрочастицы CaCO_3 (п. 2.2) были осаждены методом центрифугирования и к осадку были добавлены растворы электролитов. Смесь инкубировалась при постоянном перемешивании в течение 1 ч.

Для соосаждения, в процессе синтеза CaCO_3 (п. 2.2) полимерные электролиты были растворены в 2,5 мл воды Milli-Q и использованы в процессе синтеза, согласно описанному протоколу.

Исследование эффективности инкапсуляции было проведено методом спектрофотометрии. Для этого для соединений R66, R8 и R41 были построены калибровочные кривые, соотносящие значения адсорбции и концентрацию образцов ($\lambda=271$ нм для R8, $\lambda=226$ нм для R41, $\lambda=262$ нм для R66) (рис. 1).

Для исследования эффективности инкапсуляции соединений после процесса инкапсуляции образцы были осаждены методом центрифугирования и надосадочная жидкость была использована для получения спектра адсорбции. Эффективность инкапсуляции была высчитана как % от изначально добавленной концентрации соединения.

Снимки частиц на просвечивающем электронном микроскопе. Для исследования размеров и морфологии полученных носителей и инкапсулированных препаратов полимерных электролитов был использован просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) JEOL JEM-1011 (JEOL Ltd., Япония).

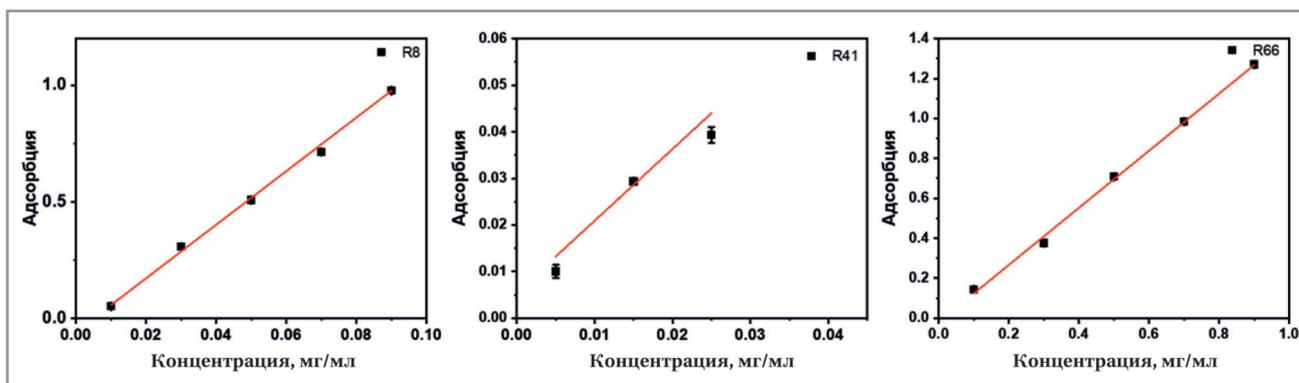


Рис. 1. Калибровочные кривые для соединений R66, R8 и R41
Fig. 1. Calibration curves for compounds R66, R8, and R41

Оценка стабильности инкапсулированных препаратов полимерных электролитов. Для исследования коллоидной стабильности полученных носителей и инкапсулированных препаратов полимерных электролитов был использован метод динамического светорассеяния. Для этого образцы инкубировались в физрастворе (0,9% NaCl) на протяжении 48 ч. В определённые временные точки (1 ч, 24 ч и 48 ч) были измерены гидродинамические диаметры с использованием Nano Particle Size Analyzer (Jinan Winner Particle Instrument Stock Co., Ltd., Китай).

Для исследования удержания полимерных электролитов носителями полученные инкапсулированные формы были отмыты водой Milli-Q трижды, и надосадочные жидкости были измерены методом спектрофотометрии. После этого инкапсулированные формы были инкубированы в физрастворе на протяжении 48 ч, и в определённые временные точки (1 ч, 3 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч) надосадочные жидкости были измерены методом спектрофотометрии.

Оценка цитотоксичности препаратов. Цитотоксичность исследуемых препаратов была оценена на культуре клеток HEp-2 при помощи МТТ-теста. Из 96-луночного планшета с клеточной культурой удаляли ростовую среду, вносили серию 2-кратных разведений препаратов на поддерживающей среде (стартовая концентрация 2000 мкг/мл), а в ряд клеточного контроля вносили среду без препарата. Далее 96-луночный планшет с разведениями препарата инкубировали в течение 6 сут.

После окончания инкубации из 96-луночного планшета удаляли поддерживающую среду и добавляли раствор МТТ в концентрации 0,5 мкг/мл, после чего инкубировали в течение 1,5 ч при температуре 37°C и 5% CO₂. По окончании срока инкубации раствор МТТ удаляли, растворяли осадок в растворе ДМСО и определяли оптическую плотность раствора при длине волны λ_{\max} =570 нм.

На основании полученных данных с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.0 была определена ЦТД₅₀ (концентрация препарата, вызывающая гибель 50% клеток).

Оценка противовирусной активности препаратов в отношении респираторно-синцитиального вируса, штамма A2. Для оценки противовирусной активности веществ в отношении респираторно-синцитиального вируса готовили серию из пяти трёхкратных разведений раствора полимера, начиная от ЦТД₅₀, в двойной концентрации и семи десятикратных разведений вируса. Из 96-луночных планшетов с клеточной культурой HEp-2 удаляли ростовую среду и промывали один раз поддерживающей средой ДМЕМ («Биолот», Россия), 20 мкг/мл ципрофлоксацина, 2% ФБС («Биолот», Россия), после чего добавляли полимер по 100 мкл на лунку и равный объём вируса, далее 1 ч инкубировали при 37°C и 5% CO₂. После планшеты промывали поддерживающей средой, снова добавляли 100 мкл препарата на лунку и равный объём поддерживающей среды, инкубировали в течение 6 сут при 37°C и 5% CO₂.

После этого лунки планшета фиксировали 100 мкл 80% раствора ацетона. Наличие вируса в клетках определяли с помощью иммуноферментного анализа (cell-ELISA).

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД₅₀). На основании полученных данных рассчитывали 50% ингибирующую концентрацию (ЭД₅₀). Критерием активности препарата служил химиотерапевтический индекс (ХТИ), представляющий собой отношение ЦТД₅₀ к ЭД₅₀. Препараты, имеющие ХТИ выше 10, считаются перспективными для дальнейшего изучения.

Результаты и обсуждение

Получение инкапсулированных препаратов полимерных электролитов. Опытные образцы CaCO₃ были получены методом соосаждения солей CaCl₂ (1 М) и Na₂CO₃ (1 М) в присутствии воды при непрерывном перемешивании. Используемая методика получения частиц является известной и была ранее применена в работах по созданию систем доставки диагностических и терапевтических химических соединений [13].

Инкапсулированные препараты полимерных электролитов были получены методиками адсорбции и соосаждения для исследования наиболее оптимального метода инкапсуляции соединений. По результатам спектрофотометрического исследования (рис. 2) наиболее эффективным способом включения соединений в носители является методика соосаждения, показавшая эффективность более 75% для всех видов соединений, а именно 94±3,76 для R8, 82±3,28 для R41 и 78±3,12 для R66.

Полученные носители и инкапсулированные препараты были исследованы с использованием ПЭМ (рис. 3, а). Носители CaCO₃ до процесса инкапсуляции демонстрируют сферическую морфологию с размерами в диапазоне 2–6 мкм. Изображения инкапсулированных препаратов демонстрируют подобные характеристики, что говорит о неизменности носителя при добавлении полимерных соединений в его структуру. Коллоидная стабильность полученных носите-

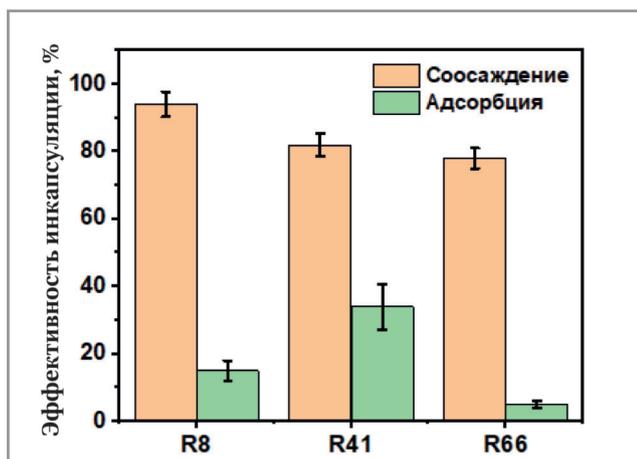


Рис. 2. График эффективности инкапсуляции (%) полимерных электролитов в носители CaCO₃ методами соосаждения и адсорбции.

Fig. 2. Graph of encapsulation efficiency (%) of polymer electrolytes in CaCO₃ carriers by coprecipitation and adsorption methods.

лей и инкапсулированных препаратов также подтверждается малыми изменениями гидродинамических диаметров образцов (рис. 3, b).

Исследование степени удержания и высвобождения запечатанных соединений в носители CaCO₃ показало следующее: в процессе отмывок инкапсулированных форм препаратов мы наблюдаем вытекание около 12% соединений для R66 и около 20% соединений для R41. Тем временем соединение R8 демонстрирует сильную связь с носителем и вытекания в процессе отмывок не происходит. После

3 этапа отмывки процент удержания соединений показал более 80% от изначально запечатанного вещества (рис. 4, a). Результаты последующего исследования вытекания соединений в течение 48 ч соотносятся с данными степени удержания (рис. 4, b). На представленном графике можно увидеть, что инкапсулированная форма соединения R41 характеризуется пролонгированным высвобождением, демонстрируя вытекание около 90% соединения на 48 ч. При этом соединения R66 и R8 обладают более сильной связью с носителем и демонстрируют не более 10% вытекания на 48 ч.

Противовирусная активность в отношении респираторно-синцитиального вируса в чистом и инкапсулированном виде. Соединение R66 в инкапсулированной форме показало уменьшение ЦТД₅₀ препарата, то есть препарат стал более цитотоксичным при одновременном увеличении ЭД₅₀.

Таким образом, для препарата R66 инкапсуляция привела к уменьшению ХТИ, что свидетельствует о меньшей перспективности применения его в инкапсулированной форме в сравнении с исходной (таблица).

При инкапсуляции соединения R41 наблюдалось снижение противовирусной активности, однако ЦТД₅₀ стала выше, чем в исходной форме.

Наиболее эффективной оказалась инкапсуляция соединения R8, где при аналогичном значении ЭД₅₀ наблюдается увеличение цитотоксической дозы в два раза. Таким образом, инкапсуляция данного соединения может положительно повлиять на степень цитотоксичности, при этом не ухуд-

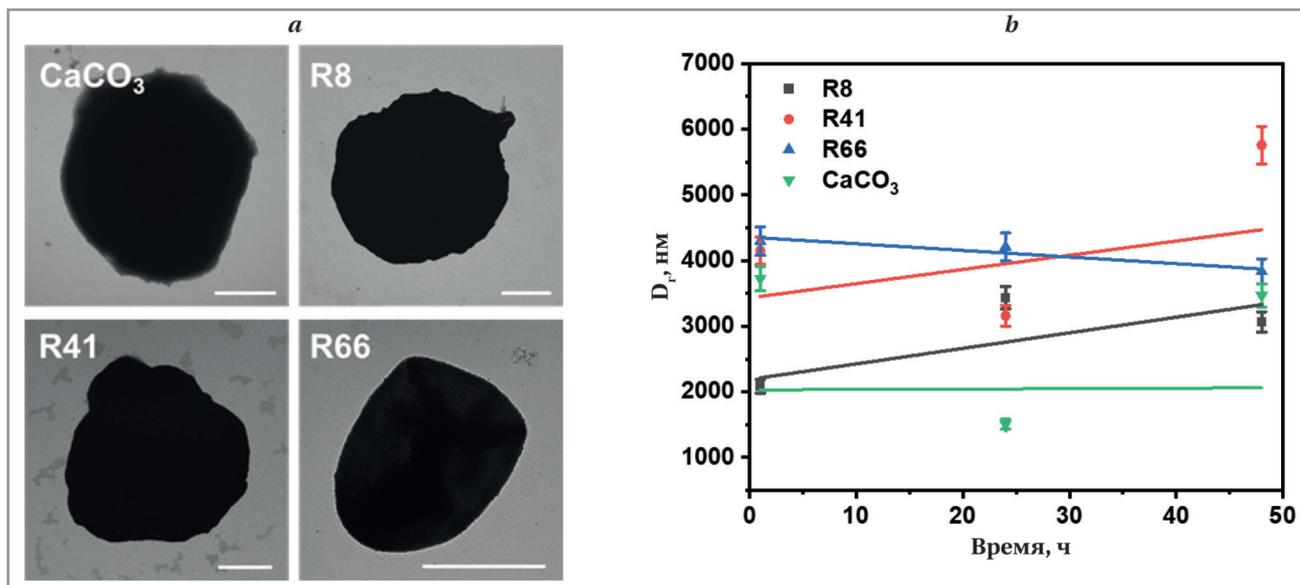


Рис. 3. a — ПЭМ изображения носителей CaCO₃ и инкапсулированных препаратов полимерных электролитов. Масштабные отрезки соответствуют 2 мкм; b — график изменения гидродинамического диаметра (D_p) CaCO₃ и инкапсулированных препаратов в процессе инкубации в физрастворе.

Fig. 3. a — TEM images of CaCO₃ carriers and encapsulated polymer electrolyte preparations. Scale bars correspond to 2 μm. b — Graph of changes in the hydrodynamic diameter (D_p) of CaCO₃ and encapsulated preparations during incubation in saline.

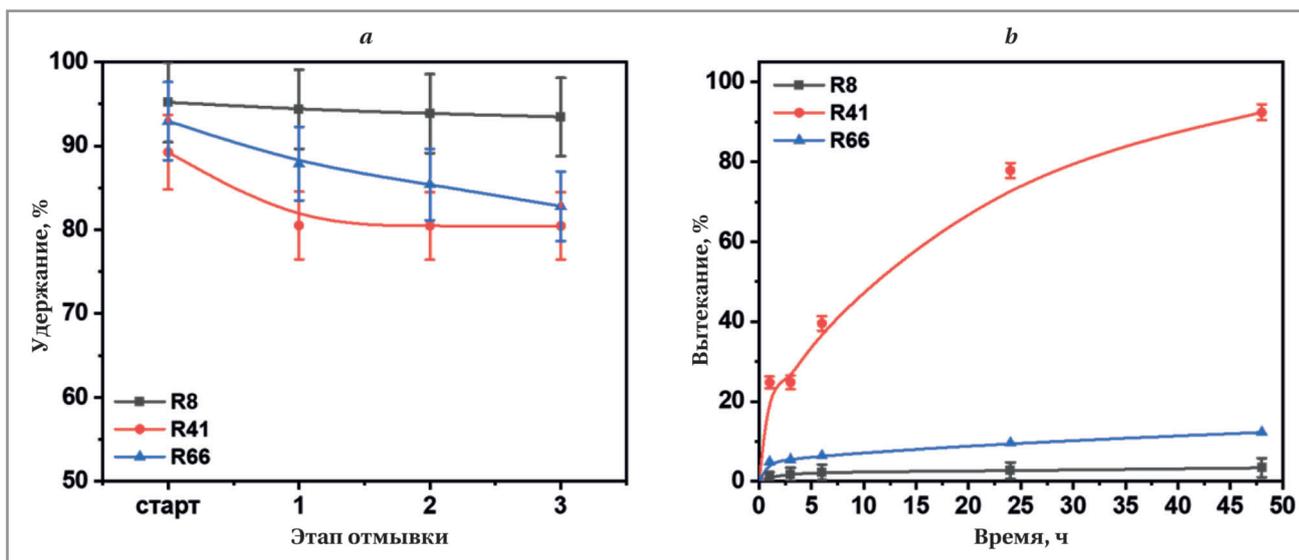


Рис. 4. *a* — график удержания (%) полимерных электролитов носителями CaCO_3 в процессе отмывок; *b* — график вытекания (%) полимерных электролитов из носителей в процессе инкубации в физрастворе.
 Fig. 4. *a* — graph of retention (%) of polymer electrolytes by CaCO_3 carriers during washing; *b* — graph of leakage (%) of polymer electrolytes from carriers during incubation in saline solution.

Противовирусная активность инкапсулированных и чистых соединений в отношении респираторно-синцитиального вируса штамма A2 на культуре клеток Hep-2
 Antiviral activity of encapsulated and pure compounds against respiratory syncytial virus strain A2 in Hep-2 cell culture

Препарат	В чистом виде			Инкапсулированный		
	ЦТД ₅₀ , МКГ/МЛ	ЭД ₅₀ , МКГ/МЛ	ХТИ	ЦТД ₅₀ , МКГ/МЛ	ЭД ₅₀ , МКГ/МЛ	ХТИ
R66	275,6	0,5	551,2	150	1,2	125
R41	35,6	0,2	178,0	150	3	50
R8	191,0	1,3	146,9	400	1,3	307,7

шая показатели 50% эффективной дозы, что в итоге позволяет получить препарат с более высоким химиотерапевтическим индексом.

Заключение

В ходе проведённой научно-исследовательской работы была подтверждена противовирусная эффективность инкапсулированных полимерных форм веществ в отношении респираторно-синцитиального вируса штамма A2.

Полученные результаты показали, что инкапсуляция соединений может способствовать снижению их цитотоксичности с сохранением их противовирусных свойств. Таким образом, дальнейшие исследования данной группы веществ и способов их доставки являются перспективными для создания эффективного и безопасного пре-

парата широкого противовирусного спектра действия. Среди исследуемых веществ наиболее перспективным является R8. Для R8 отмечена низкая степень цитотоксичности — 400 мкг/мл в сочетании с выраженным противовирусным действием (значение ЭД₅₀=1,3 мкг/мл).

Дополнительная информация

Финансирование. Статья опубликована при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках реализации программы создания и развития Научного центра мирового уровня «Передовые цифровые технологии» (Соглашение от 20.04.2022 № 075-15-2022-313, ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Baker R. E., Mahmud A. S., Miller I. F. et al. Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20 (4): 193–205. doi: 10.1038/s41579-021-00639-z.
- Bloom D. E., Cadarette D. Infectious disease threats in the twenty-first century: Strengthening the global response. *Front Immunol.* 2019; 10 (MAR). doi: 10.3389/fimmu.2019.00549.
- Gordon A., Reingold A. The burden of influenza: a complex problem. *Curr Epidemiol Rep.* 2018; 5 (1): 1–9. doi: 10.1007/s40471-018-0136-1.
- Zimmerman R. K., Balasubramani G. K., D'Agostino H. E. A. et al. Population-based hospitalization burden estimates for respiratory viruses, 2015–2019. *Influenza Other Respir Viruses.* 2022; 16 (6): 1133–1140. doi: 10.1111/irv.13040.
- Geoghegan S., Erviti A., Caballero M. T. et al. Mortality due to respiratory syncytial virus. Burden and risk factors. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017; 195 (1): 96–103. doi: 10.1164/rccm.201603-0658OC.

6. Branche A., Falsey A. Parainfluenza virus infection. *Semin Respir Crit Care Med.* 2016; 37 (04): 538–554. doi: 10.1055/s-0036-1584798.
7. Edwards K. M., Zhu Y., Griffin M. R. et al. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *New England Journal of Medicine.* 2013; 368 (7): 633–643. doi: 10.1056/NEJMoa1204630.
8. Falsey A. R., Walsh E. E. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13 (3): 371–384. doi: 10.1128/CMR.13.3.371.
9. McClellan K., Perry C. M., Aoki F. Y., Fleming D. M., Sidwell R. W., Treanor J. J. Oseltamivir A Review of Its Use in Influenza. *Drugs.* 2001; 61 (2): 263–283. doi: 10.2165/00003495-200161020-00011.
10. Kataev V. E., Garifullin B. F. Antiviral nucleoside analogs. *Chem Heterocycl Compd (N Y).* 2021; 57 (4): 326–341. doi: 10.1007/s10593-021-02912-8.
11. Sutton T. C., Scott M. D. The effect of grafted methoxypoly (ethylene glycol) chain length on the inhibition of respiratory syncytial virus (RSV) infection and proliferation. *Biomaterials.* 2010; 31 (14): 4223–4230. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.095
12. Razgulyaeva D. N., Klabukov A. M., Galochkina A. V. et al. Evaluation of the Antiviral Activity of Drugs from the Group of Polymer Electrolyte Derivatives against a Wide Range of Viruses. *Antibiot Chemother.* 2024; 68 (9–10): 34–41. doi: 10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-34-41.
13. Kastl L., Sasse D., Wulf V. et al. Multiple Internalization Pathways of Polyelectrolyte Multilayer Capsules into Mammalian Cells. *ACS Nano.* 2013; 7 (8): 6605–6618. doi: 10.1021/nn306032k.

Поступила / Received 01.02.2024

Принята в печать / Accepted 10.03.2024

Информация об авторах

Клабуков Артём Маркович — младший научный сотрудник лаборатории химиотерапии вирусных инфекций; аспирант, ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-7922-508X. Scopus: 57462956700

Разгуляева Дарья Николаевна — младший научный сотрудник лаборатории химиотерапии вирусных инфекций; аспирант, ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-1468-117X

Нестерова Наталья Александровна — научный сотрудник лаборатории № 2 Гидрофильных полимеров, Институт высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН), Санкт-Петербург, Россия. WOS: I-3945-2018. ORCID ID: 0000-0002-5459-3513

Тищенко Юлия Алексеевна — лаборант-исследователь, лаборатория нано- и микрокапсулирования биологически активных веществ, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0009-0005-1406-5344. Scopus: 58956714100

Ахметова Дарья Рамильевна — лаборант-исследователь, лаборатория нано- и микрокапсулирования биологически активных веществ, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ); младший научный сотрудник, центр «Информационные оптические технологии»; аспирант, Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия. WOS: AFY-6118-2022. ORCID ID: 0009-0003-2808-4795. Scopus: 57461062800

Гаврилова Нина Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории системной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России. WOS: GOJ-9964-2022. ORCID: 0000-0002-7825-9130. Scopus: 58025268800

Шпиловских Сергей Александрович — к. х. н., ведущий научный сотрудник, лаборатория нано- и микрокапсулирования биологически активных веществ, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ); ведущий научный сотрудник, центр «Информационные оптические технологии», Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия. WOS: B-2691-2017. ORCID ID: 0000-0002-8917-2583. Scopus: 34168423100

Штро Анна Андреевна — к. б. н., заведующий лабораторией химиотерапии вирусных инфекций, ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. WOS: H-7328-2016. ORCID ID: 0000-0002-2295-1881. Scopus: 36026022700

Панарин Евгений Федорович — д. х. н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель института; заведующий лабораторией 2 Гидрофильных полимеров, Институт высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН), Санкт-Петербург, Россия. WOS: P-1767-2016. ORCID ID: 0000-0002-7005-5838

About the authors

Artem M. Klabukov — Junior Researcher, Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections; Postgraduate Student, Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-7922-508X. Scopus: 57462956700

Darya N. Razgulyaeva — Junior Researcher, Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections; Postgraduate Student, Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-1468-117X

Natalya A. Nesterova — Researcher, Hydrophilic Polymers Laboratory No. 2, Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Branch of Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of the National Research Centre «Kurchatov Institute», Saint Petersburg, Russia. WOS: I-3945-2018. ORCID ID: 0000-0002-5459-3513

Yuliya A. Tishchenko — Research Assistant, Laboratory of Nano- and Microencapsulation of Biologically Active Substances, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0009-0005-1406-5344. Scopus: 58956714100

Darya R. Akhmetova — Research Assistant, Laboratory of Nano- and Microencapsulation of Biologically Active Substances, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University; Junior Researcher at the Information Optical Technologies Center; postgraduate student, ITMO National Research University, Saint Petersburg, Russia. WOS: AFY-6118-2022. ORCID ID: 0009-0003-2808-4795. Scopus: 57461062800

Nina V. Gavrilova — Junior Researcher, Laboratory of Systems Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. WOS: GOJ-9964-2022. ORCID: 0000-0002-7825-9130. Scopus: 58025268800

Sergei A. Shipilovskikh — Ph. D. in Chemistry, Leading Researcher, Laboratory of Nano- and Microencapsulation of Biologically Active Substances, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University; Leading Researcher, Center for Information Optical Technologies, ITMO University, Saint Petersburg, Russia. WOS: B-2691-2017. ORCID ID: 0000-0002-8917-2583. Scopus: 34168423100

Anna A. Shtro — Ph. D. in Biology, Head of the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. WOS: H-7328-2016. ORCID ID: 0000-0002-2295-1881. Scopus: 36026022700

Eugenii F. Panarin — D. Sc. in Chemistry, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director of the Institute; Head of the Hydrophilic Polymers Laboratory No. 2, Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Branch of Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of the National Research Centre «Kurchatov Institute», Saint Petersburg, Russia. WOS: P-1767-2016. ORCID ID: 0000-0002-7005-5838

Эффективность комбинации меропенем/авибактам при действии на карбапенемазопродуцирующие штаммы *Klebsiella pneumoniae* в динамической системе *in vitro*

*Е. Н. СТРУКОВА, М. В. ГОЛИКОВА, М. Б. КОБРИН,
С. А. ДОВЖЕНКО, А. В. ГОЛЫШКИН, Н. Р. АЛЬМЯШЕВА, Ю. А. ПОРТНОЙ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»),
Москва, Россия

Резюме

Актуальность. Для борьбы с инфекциями, вызванными карбапенемазопродуцирующими штаммами *K. pneumoniae*, успешно применяются комбинации карбапенемов с ингибиторами карбапенемаз нового поколения. Однако в клинике известны случаи устойчивости *K. pneumoniae* и к таким комбинациям. В этой связи важно продолжать поиск и изучение новых сочетаний антибиотик/ингибитор. В этом смысле интересна комбинация меропенем/авибактам, изучению эффективности которой посвящено данное исследование. **Цель.** Оценить эффективность комбинации меропенема с новым ингибитором карбапенемаз авибактамом при действии на штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазы, в динамической системе *in vitro*. **Методы.** Два штамма-продуцента карбапенемаз, типа КРС (*K. pneumoniae* 28) и ОХА-48 (*K. pneumoniae* 145), подвергали воздействию меропенема или его комбинации с авибактамом в динамической системе *in vitro*, где моделировали фармакокинетические профили препаратов в эпителиальной жидкости лёгких человека. Воспроизводили следующие режимы дозирования: 2000 мг меропенема и 500 мг авибактама в виде 2-часовой инфузии каждые 8 ч 5 дней. Оценивали эффект препаратов в отношении общей и устойчивых субпопуляций *K. pneumoniae* путём высева проб на агаризованные среды без меропенема и с ним в концентрациях, кратных минимальной подавляющей концентрации. **Результаты.** Меропенем не снижал численность общей популяции и не подавлял рост резистентных субпопуляций обоих штаммов, в то время как комбинирование меропенема с авибактамом заметно снижало общий бактериальный титр и полностью предотвращало рост устойчивых клеток. **Заключение.** Комбинация меропенем/авибактам представляется перспективной для применения в клинике, поскольку характеризовалась высокой эффективностью и отсутствием развития резистентности к меропенему на протяжении всего моделируемого курса терапии.

Ключевые слова: меропенем; авибактам; *K. pneumoniae*; динамическая система *in vitro*, фармакокинетика, фармакодинамика

Для цитирования: Струкова Е. Н., Голикова М. В., Кобрин М. Б., Довженко С. А., Голышкин А. В., Альмяшева Н. Р., Портной Ю. А. Эффективность комбинации меропенем/авибактам при действии на карбапенемазопродуцирующие штаммы *Klebsiella pneumoniae* в динамической системе *in vitro*. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 32–40. doi: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-32-40. EDN: MOTBYZ.

The Effectiveness of the Combined Use of Meropenem and Avibactam Against Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in an *in vitro* Dynamic Model

*ELENA N. STRUKOVA, MARIA V. GOLIKOVA, MIKHAIL B. KOBRIN,
SVETLANA A. DOVZHENKO, ALEXANDR V. GOLYSHKIN,
NAILYA R. ALMYASHEVA, YURY A. PORTNOY

Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Moscow, Russia

Abstract

Background. Combinations of carbapenems with new-generation carbapenemase inhibitors are successfully used to combat infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains. However, *K. pneumoniae* resistance to such combinations is already described. Therefore, the search for new antibiotic/inhibitor combinations is important. In this regard, meropenem/avibactam combination seems promising, with its effectiveness becoming the subject of the current study. **The aim of this study** was to evaluate the effectiveness of the combination of meropenem with the new carbapenemase inhibitor avibactam against carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strains in an *in vitro* dynamic model. **Methods.** Two carbapenemase-producing strains, КРС (*K. pneumoniae* 28) and ОХА-48 (*K. pneumoniae* 145), were exposed to meropenem or its combination with avibactam in the hollow fiber infection model that simulated the pharmacokinetic profiles of drugs in the human lung epithelial fluid. The following dosage regimens were simulated: 2000 mg of meropenem

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



*Correspondence to:
E-mail: kindyn@yandex.ru



EDN: MOTBYZ

and 500 mg of avibactam as a 2-hour infusion every 8 hours during 5 days. The effect of the drugs on the total and resistant subpopulations of *K. pneumoniae* was evaluated by plating samples on agar media without and with meropenem at different MIC-fold concentrations. **Results.** Meropenem alone did not reduce the numbers of the total population and did not suppress the growth of resistant subpopulations of both strains, while combining meropenem with avibactam significantly reduced the total bacterial numbers and completely prevented the growth of resistant cells. **Conclusion.** The combination of meropenem/avibactam seems promising, due to the fact that it was characterized by high efficacy and a lack of development of resistance to meropenem throughout the entire simulated course of therapy.

Keywords: meropenem, avibactam; *K. pneumoniae*; hollow fiber infection model, pharmacokinetics, pharmacodynamics.

For citation: Strukova E. N., Golikova M. V., Kobrin M. B., Dovzhenko S. A., Golyshkin A. V., Almyasheva N. R., Portnoy Yu. A. The effectiveness of the combined use of meropenem and avibactam against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in an *in vitro* dynamic model. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 32–40. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-32-40>. EDN: MOTBYZ. (in Russian)

Введение

Нозокомиальные штаммы *Klebsiella pneumoniae* с множественной устойчивостью к антибиотикам являются серьёзной проблемой современного здравоохранения. В арсенале врачей остаётся всё меньше эффективных препаратов, в том числе под угрозой оказались антибиотики группы карбапенемов, которые являются препаратами выбора при лечении больных, инфицированных нозокомиальными штаммами *K. pneumoniae*. Ведущим механизмом устойчивости к карбапенемам у клебсиелл является продуцирование ферментов, разрушающих антибиотик — карбапенемаз [1].

В РФ наиболее распространены штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазы типов NDM, KPC и OXA-48 [2]. Для лечения пациентов с инфекциями, вызванными такими штаммами, применяются комбинации бета-лактамов с ингибиторами бета-лактамаз. За последние 10 лет в клиническую практику было введено несколько новых комбинаций, в состав которых входят ингибиторы бета-лактамаз нового поколения, такие как авибактам (комбинация цефтазидим/авибактам [3], азтреонам/авибактам [4]), релебактам (имипенем/релебактам [5]), ваборбактам (меропенем/ваборбактам [5]). Перечисленные комбинации показали свою высокую эффективность при применении в клинике [6].

Однако уже зарегистрированы случаи выделения штаммов *K. pneumoniae*, устойчивых и к этим препаратам [7–9]. Учитывая этот факт, необходимо продолжать поиск новых эффективных комбинаций карбапенемов с ингибиторами карбапенемаз. Исследования по изучению эффективности клинических курсов антибиотикотерапии можно осуществлять при помощи динамических систем *in vitro*. Динамические системы позволяют моделировать изменение концентрации антибиотика (фармакокинетику) так, как это происходит у человека в месте действия препарата, и оценивать его антибактериальный эффект (фармакодинамику).

В работе проведено изучение эффективности новой комбинации меропенема с авибактамом в отношении карбапенемазопродуцирующих штаммов *K. pneumoniae* в динамической системе *in vitro*,

в которой моделировали фармакокинетику комбинации в эпителиальной жидкости лёгких (ЭЖЛ, модель пневмонии).

Материал и методы

Антибиотики и бактериальные штаммы. Субстанция меропенема была приобретена в Tokyo Chemical Industry (Co. LTD, Япония), субстанция авибактама — в AChemBlock (США), субстанция дорипенема — в Acros Organics (США), субстанция азтреонама — в Clearysynth (Индия). В работе использовали клинические изоляты *K. pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазы типа KPC — *K. pneumoniae* 28 и типа OXA-48 — *K. pneumoniae* 145.

Оценка значений минимальной подавляющей концентрации (МПК) и минимальной концентрации, подавляющей рост устойчивых мутантов (МПК_М) меропенема при его применении отдельно и в комбинации с авибактамом. Значения МПК устанавливали методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона (МХБ, Becton Dickenson, США), содержащем 24-часовую культуру микроорганизма (концентрация 5×10^5 КОЕ/мл) [10]. МПК меропенема в присутствии авибактама определяли при фиксированной концентрации ингибитора, равной 4 мкг/мл, в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам [11].

Значения МПК_М определяли согласно ранее описанной методике [12]. Вкратце, тестируемые микроорганизмы культивировали в МХБ в течение 24 ч. Затем суспензию центрифугировали (4000 g в течение 10 мин) и ресуспендировали в МХБ до получения концентрации $\sim 10^{10}$ КОЕ/мл. Затем высевали с использованием серийных разведений на чашки с агаризованной средой, содержащей меропенем (концентрации в диапазоне от 0,5 до 2048 мкг/мл) отдельно и в присутствии 4 мкг/мл авибактама. Чашки инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C и оценивали число выросших колоний. За МПК_М принимали наименьшую концентрацию меропенема, при которой рост бактерий полностью подавлялся.

Эксперименты в динамической системе *in vitro*. В данном исследовании использовали модифицированную динамическую систему *in vitro* диализного типа [13]. Система состоит из камеры с МХБ, биореактора с полыми волокнами, имитирующего очаг инфекции (диализатор Fresenius, модель AV400S, Германия), и камеры с антибиотиком или комбинацией антибиотик/ингибитор. В биореакторе культивируют клетки бактерий и имитируют фармакокинетический профиль изучаемого препарата или их комбинации. С помощью программируемых перистальтических насосов происходит введение препарата в биореактор, а также подача свежей питательной среды для воспроизведения заданных фармакокинетических профилей. При помощи перистальтических насосов также осуществляется постоянное перемешивание содержимого биореактора для равномерного распределения молекул антибиотика и клеток бактерий.

Перед началом опыта систему стерилизовали, заполняли свежим МХБ и термостатировали при 37°C. В центральную камеру вносили 18-часовую культуру микроорганизма. После двухчасовой инкубации плотность бактериальной суспензии достигала 10^8 КОЕ/мл, и включалась автоматическая система ввода антибиотика. На протяжении эксперимента из биореактора ежедневно отбирали пробы, последовательно разводили стерильной водой и высевали на чашки с агаром без антибиотика и содержащим меропенем в концентрации, кратной его МПК в отношении изучаемого микроорганизма (2х, 4х, 8х и 16хМПК). Чашки помещали в термостат при температуре 37°C на 24–48 ч, затем подсчитывали колонии. Нижний предел определения для чувствительных клеток составлял 100 КОЕ/мл, для устойчивых — 10 КОЕ/мл. По результатам рассчитывали среднеарифметические значения концентрации бактерий и стандартные отклонения (СО).

Моделируемые в динамической системе *in vitro* фармакокинетические профили меропенема и авибактама. В динамической системе *in vitro* воспроизводили фармакокинетические профили меропенема и авибактама в ЭЖЛ, построенные при помощи линейной одночастевой модели. Для этого были использованы данные определения уровней концентрации препаратов в ЭЖЛ у здоровых добровольцев после применения 2000 мг меропенема в виде 3-часовой инфузии каждые 8 ч и 500 мг авибактама в виде 2-часовой инфузии каждые 8 ч [14, 15]. Расчётные значения параметров фармакокинетики меропенема и авибактама, используемые для воспроизведения их фармакокинетических профилей в динамической системе, были следующие: максимальное значение концентрации ($C_{\text{МАКС}}$) — 38 и 5 мкг/мл, соответственно; время достижения максимального значения концентрации ($T_{\text{МАКС}}$) — 2 ч; период полувыведения ($T_{1/2}$) — 1,5 ч.

Определение концентраций меропенема и авибактама в биообразцах методом хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Для оценки соответствия смоделированных фармакокинетических профилей препаратов заданным, на протяжении всего эксперимента из биореактора отбирали пробы: до начала инфузии (кроме нулевого часа), сразу после её окончания и через 6 ч после начала инфузии. Методику определения концентраций авибактама и меропенема в биопробах разработали на основе ранее опубликованной нами методики [16].

Для определения концентраций меропенема в качестве внутреннего стандарта использовали дорипенем, авибактама — азтреонам. Определение концентраций анализов в биопробах проводили на хроматографе Dionex Ultimate 3000, (Thermo Scientific, США) с масс-спектрометрическим детектором TSQ Quantum Access MAX (Thermo Scientific, США). Разделение проводили на колонке Atlantis HILIC silica, 3 мкм, 2,1×50 мм (Waters, США). Для построения калибровочной кривой использовали свежеприготовленные растворы авибактама и меропенема в бульоне с концентрациями, равными 12,0; 8,0; 1,0; 0,4; 0,2; 0,0 мкг/мл и 60,0; 40,0; 5,0; 2,0; 1,0; 0,0 мкг/мл, соответственно. Растворы внутренних стандартов, азтреонама и дорипенема, с концентрациями 315,0 и 137,5 мкг/мл, соответственно, готовили в смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1:1 непосредственно перед использованием. В пробирки типа «эппендорф» помещали по 180 мкл калибровочных растворов, прибавляли по 40 мкл раствора внутренних стандартов, перемешивали, аккуратно встряхивая пробирку руками. К содержимому пробирок прибавляли по 880 мкл ацетонитрила. Содержимое пробирок встряхивали в течение 1 мин на шейкере, центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об/мин и температуре 5°C. Супернатант (0,7 мл) помещали в вials для автосамплера. Испытуемые растворы готовили аналогичным образом: в пробирки типа «эппендорф» помещали по 180 мкл испытуемых образцов, прибавляли по 40 мкл раствора внутренних стандартов. Далее обрабатывали, как описано выше.

Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме элюирования. Подвижная фаза: 5 мМ рас-

твор ацетата аммония в воде (рН 4,5) — ацетонитрил (1:4). Скорость подачи элюента — 150 мкл/мин. Объём вводимой пробы — 5 мкл. Температура колонки — 20°C. Температура автосамплера — 10°C. Время удерживания авибактама — 1,0 мин, азтреонама — 1,6 мин, дорипенема — 3,0 мин, меропенема — 5,9 мин. Время поступления элюата в детектор — с 0,6 по 2,3 мин и с 2,75 по 6,5 мин. Время анализа — 6,6 мин. Детектирование проводили с помощью источника ионизации электрораспылением (HESI-II) в режиме регистрации выбранных ионных реакций (SRM) в отрицательной полярности от начала анализа до 2,4 мин и в положительной полярности с 2,4 до 6,6 мин. Напряжение на распылительном капилляре — 4000 В, температура распылительного капилляра — 100°C, температура входного капилляра — 200°C; поток основного распылительного газа «SheathGas» (азот) — 20 у. е.; давление газа — реагента (аргон) в ячейке соударений — 1,5 мТорр. Q1/Q3 массы: авибактама — 263,9 [M–H]⁻/96,2 а. е. м., азтреонама — 434,0 [M–H]⁻/96,2 а. е. м., дорипенема — [M+H]⁺ 421,1/274,0 а. е. м., меропенема — [M+H]⁺ 384,2/141,2 а. е. м. Энергия фрагментации «Collision Energy» — 41 В, 23 В, 17 В, 16 В (авибактам, азтреонам, дорипенем и меропенем, соответственно). Параметр «Tube Leans» — 140 В, –160 В, 190 В, 185 В (авибактам, азтреонам, дорипенем и меропенем, соответственно).

Калибровочная кривая для авибактама была линейна ($r^2 \geq 0,9997$) в диапазоне концентраций от 0,2 до 12,0 мкг/мл. Относительные стандартные отклонения RSD были менее 3,48%. Нижний предел обнаружения авибактама составлял 40 нг/мл. Калибровочная кривая для меропенема описывалась квадратичной функцией ($r^2 \geq 0,9897$) в диапазоне концентраций от 1,0 до 60,0 мкг/мл. Относительные стандартные отклонения RSD были менее 10,89%. Нижний предел обнаружения меропенема составлял 80 нг/мл. По результатам рассчитывали среднеарифметические значения концентрации меропенема и авибактама и стандартные отклонения (СО).

Результаты и обсуждение

При применении меропенема отдельно (без ингибитора) оба штамма *K. pneumoniae* разрушали антибиотик. Концентрации меропенема в системе были ниже запланированных значений примерно в 2 раза уже после 4 введения, а после 48 ч эксперимента и вплоть до его окончания были ниже предела обнаружения. При моделировании комбинированного режима применения меропенема и авибактама фактические значения концентрации обоих препаратов были близки к заданным, что указывает на протекторную функцию авибактама как ингибитора карбапенемаз.

Результаты определения чувствительности штаммов *K. pneumoniae* 28 и 145 к меропенему, а также значения МПК_М для этих штаммов при применении антибиотика отдельно и в комбинации с авибактамом приведены в табл. 1.

При моделировании режима монотерапии меропенемом численность общей популяции обоих штаммов *K. pneumoniae* после незначительного снижения на 6-й час эксперимента возрастала до максимального уровня (~10 log КОЕ/мл) и оставалась на этом уровне до окончания периода наблюдения (рис. 1, а, b сплошные линии).

В случае комбинирования антибиотика с авибактамом исходная численность популяции обоих штаммов снижалась до ~3 log КОЕ/мл

Таблица 1. Результаты определения значений МПК и МПК_М меропенема отдельно и в присутствии авибактама

Штамм <i>K. pneumoniae</i>	Меропенем		Меропенем в присутствии 4 мкг/мл авибактама	
	МПК, мкг/мл	МПК _М , мкг/мл	МПК, мкг/мл	МПК _М , мкг/мл
28	32	2048	0,5	4
145	2	256	0,25	16

Таблица 2. Значения параметров T_{>МПК} и T_{>МПКМ}, рассчитанные для моделируемых в динамической системе *in vitro* режимов применения меропенема отдельно или в комбинации с авибактамом

Table 2. Values of the parameters T_{>MIC} and T_{>MICM} calculated for the regimens of meropenem administered alone or in combination with avibactam simulated in a dynamic *in vitro* system

Штамм <i>K. pneumoniae</i>	T _{>МПК}		T _{>МПКМ}	
	Монотерапия % от ИД	Комбинация % от ИД	Монотерапия % от ИД	Комбинация % от ИД
28	14	100	0	80
145	100	100	0	40

Примечание. ИД — интервал дозирования.

Note. ИД — dosage interval.

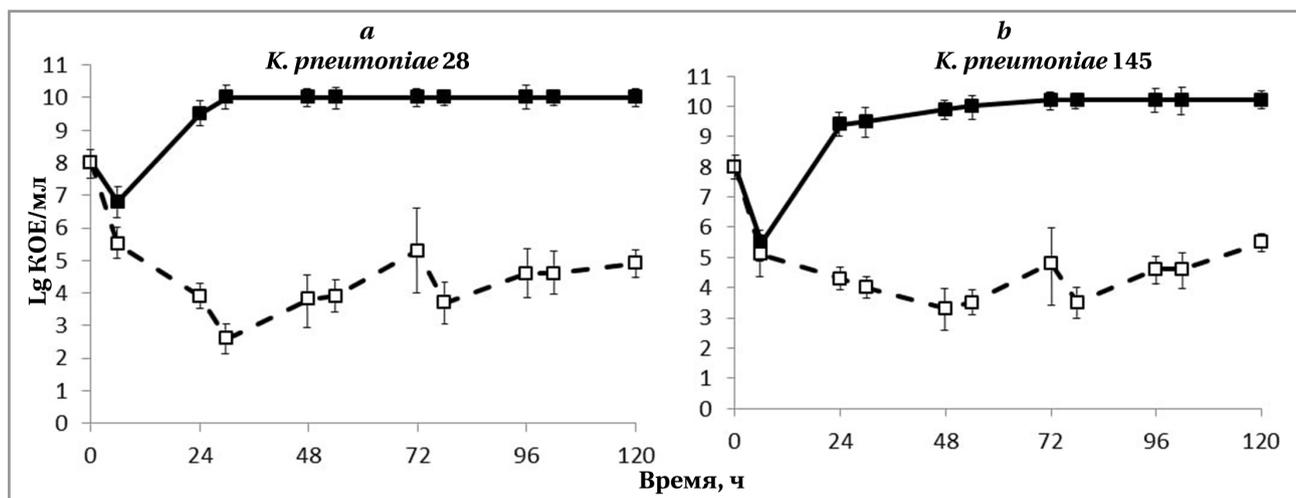


Рис. 1. Кривые изменения численности клеток *K. pneumoniae* 28 (a) и *K. pneumoniae* 145 (b) под действием меропенема, применяемого отдельно (сплошные линии и заштрихованные символы) и в комбинации с авибактамом (пунктирные линии и незаштрихованные символы).

Fig. 1. Curves reflecting changes in the number of *K. pneumoniae* 28 (a) and *K. pneumoniae* 145 (b) cells under the influence of meropenem used alone (solid lines and shaded symbols) and in combination with avibactam (dashed lines and open symbols).

(рис. 1 a, b, пунктирные линии). После этого происходило постепенное возрастание концентрации клеток вплоть до уровня ~5 log КОЕ/мл к концу наблюдения. Однако полного восстановления общей популяции как *K. pneumoniae* 28, так и 145 не происходило. Таким образом, меропенем в виде монотерапии не оказывал значимого действия на клетки *K. pneumoniae*.

Можно попытаться это объяснить, используя фармакокинетико-фармакодинамический параметр T_{>МПК} (время в % от интервала дозирования, в течение которого профиль антибиотика превышает уровень МПК) (табл. 2). Этот параметр традиционно используется для прогнозирования

эффективности бета-лактамов, его пороговое значение (минимальное значение, при котором обеспечивается эффективность лечения) для меропенема и бактерий семейства Enterobacteriales составляет 50% [17, 18]. То есть, концентрация меропенема должна быть выше его значения МПК для конкретного штамма, не менее чем 50% времени от интервала дозирования.

В нашем исследовании при моделировании монотерапии меропенемом значение T_{>МПК} составило 14% для *K. pneumoniae* 28 и 100% для *K. pneumoniae* 145. Сопоставление этих значений с пороговым объясняет отсутствие антимикробного эффекта антибиотика в отношении штамма

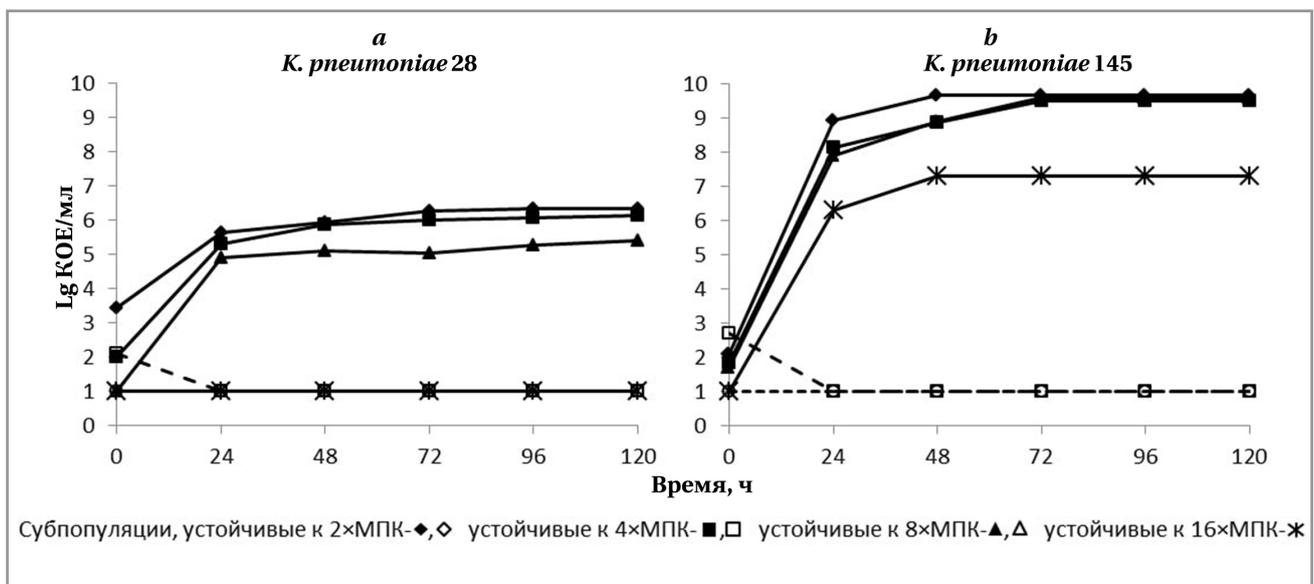


Рис. 2. Кривые изменения численности субпопуляций *K. pneumoniae*, устойчивых к 2–16×МПК меропенема, при моделировании режима применения антибиотика отдельно (сплошные линии и заштрихованные символы) и в комбинации с авибактамом (пунктирные линии и незаштрихованные символы).
Fig. 2. Curves reflecting changes in the number of *K. pneumoniae* subpopulations resistant to 2–16×MIC of meropenem when simulating the regimen of meropenem use alone (solid lines and shaded symbols) and in combination with avibactam (dashed lines and open symbols).

K. pneumoniae 28. Он изначально устойчив к меропенему, и уровни антибиотика, моделируемые в системе, недостаточно долго превышали значение МПК меропенема для этого штамма.

Однако штамм *K. pneumoniae* 145 чувствителен к меропенему, при этом антибиотик (также, как и в случае с устойчивым штаммом) не был эффективен, хотя расчётное значение параметра $T_{>МПК}$ составило 100%. Объяснением этому факту является интенсивная продукция штаммом карбапенемаз, и меропенем, даже при значении $T_{>МПК}$, равном 100%, был ими разрушен. Это подтверждается результатами определения концентрации антибиотика в системе. Таким образом, параметр $T_{>МПК}$ при прогнозировании эффективности лечения меропенемом в случае, если бактериальный штамм является продуцентом карбапенемаз, не стоит считать оптимальным.

Для комбинаций, когда значение МПК антибиотика заметно снижается в присутствии ингибитора, так как он «нейтрализует» действие карбапенемаз, параметр $T_{>МПК}$ может иметь прогностическую ценность. Так, в исследованиях 2021–2022 гг. были определены пороговые значения $T_{>МПК}$ для комбинаций бета-лактамов с ингибиторами бета-лактамаз, в том числе с авибактамом, составившие 74% [19] и 76% [20]. В нашем исследовании для комбинации меропенема с авибактамом значения $T_{>МПК}$ составили 100% для обоих штаммов, и хотя общая популяция не была полностью подавлена, её численность заметно снизилась, и эффект был выраженным.

Наряду с оценкой динамики изменения общей численности клеток *K. pneumoniae* под действием меропенема отдельно и в комбинации с авибактамом, мы оценивали динамику изменения численности резистентных к меропенему клеток (рис. 2).

Как видно из рис. 2, при введении меропенема отдельно наблюдался рост устойчивых субпопуляций обоих штаммов *K. pneumoniae*. При этом резистентные субпопуляции изначально более устойчивого к меропенему штамма *K. pneumoniae* 28 (см. рис. 2, а) демонстрировали умеренный рост. Устойчивые к 2× и 4×МПК антибиотика клетки достигали численности, равной 6 log КОЕ/мл, к 8×МПК — 5 log КОЕ/мл, а устойчивые к 16×МПК меропенема не росли вовсе. Добавление авибактама к меропенему приводило к полному подавлению роста субпопуляций всех уровней резистентности (см. рис. 2, а, пунктирные линии). Чувствительный к меропенему штамм *K. pneumoniae* 145 при введении антибиотика демонстрировал очень быстрый и активный рост численности субпопуляций, устойчивых к 2–8×МПК меропенема — до ~10 log КОЕ/мл (см. рис. 2, б), совпадающий с ростом численности общей популяции. Лишь устойчивые к 16×МПК меропенема клетки выросли до уровня ~7 log КОЕ/мл. И снова добавление авибактама к меропенему подавляло рост резистентных субпопуляций всех уровней (см. рис. 2, б).

Отличия в росте устойчивых субпопуляций между штаммами при моделировании режима монотерапии меропенемом могут быть объ-

яснены с позиций концепции «окна селекции мутантов» (ОСМ). Согласно этой концепции чем дольше антибиотик оказывается в пределах ОСМ, тем интенсивнее происходит развитие устойчивости [21–25]. Учитывая расположение фармакокинетического профиля антибиотика относительно ОСМ можно прогнозировать риски развития резистентности или вероятность её подавления. Наиболее ценным с этой точки зрения является фармакокинетико-фармакодинамический параметр $T_{>MПКМ}$, который отражает время, в течение которого профиль антибиотика превышает уровень $MПК_M$: чем выше его значение, тем ниже вероятность развития резистентности. Определению пороговых значений параметра $T_{>MПКМ}$ (минимальных значений, при которых обеспечивается подавление роста устойчивых клеток) был посвящён ряд работ, однако бета-лактамы остаются малоизученными. В нескольких работах авторы устанавливали пороговые значения параметра $T_{>MПКМ}$ для бета-лактамов, которые составили от 20 до 50% [26, 27]. Для комбинаций бета-лактамов с ингибиторами бета-лактамаз порогового значения параметра $T_{>MПКМ}$ до сих пор установлено не было. В одной работе авторы изучали развитие резистентности к азтреонаму в присутствии авибактама, и было показано, что добавление ингибитора к антибиотику повысило значение параметра $T_{>MПКМ}$ с 0 до 80%, что обеспечило полное подавление роста устойчивых клеток *K. pneumoniae* и *Escherichia coli* [28]. Однако режимов дозирования комбинации азтреонам/авибактам, которые бы характеризовались более низкими значениями параметра $T_{>MПКМ}$ в рассматриваемой работе не моделировали, поэтому авторы не называют это значение пороговым. Таким образом, для определения этой величины нужно больше данных.

В настоящем исследовании в случае со штаммом *K. pneumoniae* 145 фармакокинетический профиль меропенема не достигал уровня $MПКМ$ ($T_{>MПКМ}=0\%$) и находился внутри ОСМ на протяжении 100% интервала дозирования (см. табл. 2), что приводило к интенсивному росту устойчивых клеток. В случае с *K. pneumoniae* 28 значение $T_{>MПКМ}$ также было равно 0%. Однако даже уровень $MПК$ концентрации меропенема превышали всего 14% времени (от интервала дозирования). Если концентрации значительную часть времени оказываются ниже уровня $MПК$, развития устойчивости не наблюдается или оно незначительное. Именно поэтому развитие устойчивости *K. pneumoniae* 28 к меропенему было умеренным.

Добавление к меропенему авибактама заметно снижало как значения $MПК$ антибиотика для обоих штаммов, так и значения $MПК_M$ (см. табл. 1). То есть, границы ОСМ для меропенема при его сочетанном применении с авибак-

тамом сдвинулись в область более низких значений. Это, в свою очередь, привело к увеличению расчётных значений параметра $T_{>MПКМ}$ для обоих штаммов по сравнению с таковыми для режима монотерапии меропенемом: для *K. pneumoniae* 145 с 0 до 40%, а для *K. pneumoniae* 28 — с 0 до 80%. Указанные изменения величин параметра $T_{>MПКМ}$ свидетельствуют о возрастании «анти-мутантных» свойств (способность предотвращать развитие резистентности) комбинированного режима по сравнению с монотерапией. Таким образом, можно предположить, что значение параметра $T_{>MПКМ}$, равное 40%, позволяет преодолеть резистентность штаммов к меропенему в присутствии авибактама, и оно близко к установленным пороговым значениям параметра $T_{>MПКМ}$ для бета-лактамов (20–50% [26, 27]).

В статье 2023 г. [16] мы изучали эффективность и «анти-мутантные» свойства комбинации дорипенем/релебактам, в ней был использован тот же штамм *K. pneumoniae* 28. Используя результаты этого исследования, мы можем непосредственно сопоставить эффекты комбинаций дорипенем/релебактам и меропенем/авибактам. Вторичный рост общей численности *K. pneumoniae* 28 был выражен слабее на фоне воздействия меропенема в комбинации с авибактамом, чем дорипенема в комбинации с релебактамом. Кроме того, рост устойчивых к меропенему клеток был полностью подавлен, тогда как рост устойчивых к дорипенему клеток — нет. Эти наблюдения объясняются разницей в величинах $T_{>MПКМ}$, которая для дорипенема в присутствии релебактама составила всего 5% по сравнению с 80% для меропенема с авибактамом. Комбинации антибиотик/ингибитор, основанные на применении авибактама, например, цефтазидим/авибактам, также, как и меропенем/авибактам, проявляют высокую эффективность при действии на карбапенемазопродуцирующие штаммы *K. pneumoniae* [20].

Существенным ограничением данной работы является изучение всего двух штаммов *K. pneumoniae*, хоть и с разной чувствительностью к меропенему и продуцирующими карбапенемазы разных типов. Кроме того, для корректной оценки пороговых значений параметра $T_{>MПКМ}$ для комбинации меропенем/авибактам необходимо проведение дополнительных экспериментов с моделированием более широкого диапазона доз препаратов с разными значениями параметра $T_{>MПКМ}$. В этой связи необходима дальнейшая работа по оценке перспективности комбинации меропенема с авибактамом.

Заключение

В данном исследовании авибактам предотвратил разрушение меропенема бактериаль-

ными карбапенемазами в динамической системе *in vitro* и усилил его антимикробный эффект при воздействии как на общую, так и на устойчивые субпопуляции *K. pneumoniae*. Без авибактама, несмотря на высокое значение параметра $T_{>МПК}$ (100%) для чувствительного к меропенему штамма *K. pneumoniae* 145, меропенем был неэффективен. Таким образом, в случае продуцентов бета-лактамаз параметр $T_{>МПК}$ не является надёжным предиктором эффективности. Снижение значений МПК и МПК_М меропенема в присутствии авибактама (границ ОСМ) привело к повышению значений фармакокинетико-фармакодинамического параметра, предиктора развития резистентности, $T_{>МПКМ}$ от 0 до 40 и 80% для *K. pneumoniae* 145 и *K. pneumoniae* 28 соответственно, что обеспечило подавление роста устойчивых к меропенему клебсиелл.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование проведено благодаря финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РФФ, соглашение № 23-25-00524 от 13.01.2023 г.).

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Литература/References

1. Яковлев С. В., Суворова М. П., Быков А. О. Инфекции, вызванные карбапенеморезистентными энтеробактериями: эпидемиология, клиническое значение и возможности оптимизации антибактериальной терапии. *Антибиотики и химиотер.* 2020; 65 (5–6): 41–69. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-5-6-41-69>. [Yakovlev S. V., Suvorova M. P., Bykov A. O. Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriales: Epidemiology, Clinical Significance, and Possibilities for Antibiotic Therapy Optimization. *Antibiot Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2020; 65 (5–6): 41–69. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-5-6-41-69>. (in Russian)]
2. Кузьменков А. Ю., Виноградова А. Г., Трушин И. В., Эйдельштейн М. В., Авраменко А. А., Дехнич А. В., Козлов Р. С. AMRmap — система мониторинга антибиотикорезистентности в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2021; 23 (2): 198–204. doi: <https://doi.org/10.36488/сmac.2021.2.198-204>. [Kuz'menkov A. Yu., Vinogradova A. G., Trushin I. V., Eidel'shteyn M. V., Avramenko A. A., Dekhnich A. V., Kozlov R. S. AMRmap — sistema monitoringa antibiotikorezistentnosti v Rossii. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya.* 2021; 23 (2): 198–204. doi: <https://doi.org/10.36488/сmac.2021.2.198-204>. (in Russian)]
3. Козлов Р. С., Стецюк О. У., Андреева И. В. Цефтазидим–авибактам: новые «правила игры» против полирезистентных грамотрицательных бактерий. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2018; 20 (1): 24–34. doi: <https://doi.org/10.36488/сmac.2018.1.24-34>. [Kozlov R. S., Stetsjyuk O. U., Andreeva I. V. Tseftazidim–avibaktam: novye «pravila igry» protiv polirezistentnykh gramotritsatel'nykh bakterij. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya.* 2018; 20 (1): 24–34. doi: <https://doi.org/10.36488/сmac.2018.1.24-34>.]
4. Mauri C., Maraolo A. E., Di Bella S., Luzzaro F., Principe L. The revival of aztreonam in combination with avibactam against metallo-beta-lactamase-producing gram-negatives: a systematic review of in vitro studies and clinical cases. *Antibiotics (Basel).* 2021; 20; 10 (8): 1012. doi: [10.3390/antibiotics10081012](https://doi.org/10.3390/antibiotics10081012).
5. Zhanel G. G., Laurence C. K., Adam H., Schweizer F., Zelenitsky S., Zhanel M., Lagacé-Wiens P. R. S., Walkty A., Denisuk A., Golden A., Gin A. S., Hoban D. J., Lynch J. P. 3rd, Karlowsky J. A. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem-beta-Lactamase

Участие авторов. Струкова Е. Н. — общее руководство работой, планирование исследования, анализ и интерпретация результатов на всех этапах исследования; проведение исследований в динамической системе *in vitro* и оценка динамики численности общей популяции клеток и устойчивых к антибиотику субпопуляций культуральными методами; написание, редактирование и проверка текста публикации. Голикова М. В. — планирование исследования; написание, редактирование и проверка текста публикации; финальное утверждение рукописи. Довженко С. А. — разработка методики и определение концентраций меропенема и авибактама в биопробах. Кобрин М. Б. — разработка методики и определение концентраций меропенема и авибактама в биопробах. Гольшукин А. В. — проведение исследований в динамической системе *in vitro*. Альмяшева Н. Р. — проведение исследований в динамической системе *in vitro*. Портной Ю. А. — построение модели фармакокинетики и расчёт фармакокинетических профилей меропенема и авибактама в динамической системе *in vitro* на основе данных литературы.

- Inhibitor Combinations. *Drugs.* 2018; 78 (1): 65–98. doi: [10.1007/s40265-017-0851-9](https://doi.org/10.1007/s40265-017-0851-9).
6. Yahav D., Giske C. G., Grāmatniece A., Abodakpi H., Tam V. H., Leibovici L. New β-lactam-β-lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Rev.* 2020; 11;34 (1): e00115–20. doi: [10.1128/CMR.00115-20](https://doi.org/10.1128/CMR.00115-20).
7. Hobson C. A., Pierrat G., Tenaillon O., Bonacorci S., Bercot B., Jaouen E., Jacquier H., Birgy A. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase variants resistant to ceftazidime-avibactam: an evolutionary overview. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022; 20;66 (9): e0044722. doi: [10.1128/aac.00447-22](https://doi.org/10.1128/aac.00447-22).
8. Gaibani P., Como F., Bussini L., Lazzarotto T., Amadesi S., Bartoletti M., Viale P., Ambretti S. Dynamic evolution of imipenem/relebactam resistance in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from a single patient during ceftazidime/avibactam-based treatments. *J Antimicrob Chemother.* 2022; 77 (6): 1570–1577. doi: [10.1093/jac/dkac100](https://doi.org/10.1093/jac/dkac100).
9. Gaibani P., Lombardo D., Bussini L., Bovo F., Munari B., Giannella M., Bartoletti M., Viale P., Lazzarotto T., Ambretti S. Epidemiology of meropenem/vaborbactam resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infections in Northern Italy. 2018; *Antibiotics (Basel).* 2021; 10: 536. doi: [10.3390/antibiotics10050536](https://doi.org/10.3390/antibiotics10050536).
10. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022. Исследование чувствительности инфекционных агентов, и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод микроразведений в бульоне для лабораторного исследования активности антимикробных агентов по отношению к быстрорастущим аэробным бактериям, вызывающим инфекционные заболевания. [Natsional'nyj standart Rossijskoj Federatsii GOST R ISO 20776-1-2022. Issledovanie chuvstvitel'nosti infektsionnykh agentov, i otsenka funktsional'nykh kharakteristik izdelij dlya issledovaniya chuvstvitel'nosti k antimikrobnym sredstvam. Chast' 1. Referentnyj metod mikrorazvedenij v bul'one dlya laboratornogo issledovaniya aktivnosti antimikrobnnykh agentov po otnosheniyu k bystrorastushchim aerobnym bakteriyam, vyzyvayushchim infektsionnye zabolevaniya. (in Russian)]
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing — EUCAST [Internet]. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 13.1. 2023. [cited 2024 July 30]. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints
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. doi: 10.1128/AAC.43.7.1756.
13. Патент № RU 2787393. Голикова М. В., Фирсов А. А., Струкова Е. Н., Портной Ю. А. Модифицированная динамическая система *in vitro* (м-дс) для фармакокинетико-фармакодинамических исследований с антимикробными препаратами. Оpubл. 09.01.2023. [Patent № RU 2787393. Golikova M. V., Firsov A. A., Strukova E. N., Portnoy Ju. A. Modifitsirovannaya dinamicheskaya sistema *in vitro* (m-ds) dlya farmakokinetic-farmakodinamicheskikh issledovaniy s antimikrobnymi preparatami. Opubl. 09.01.2023. (in Russian)]
 14. Nicolau D. P., Siew L., Armstrong J., Li J., Edeki T., Learoyd M., Das S. Phase 1 study assessing the steady-state concentration of ceftazidime and avibactam in plasma and epithelial lining fluid following two dosing regimens. J Antimicrob Chemother. 2015; 70 (10): 2862–2869. doi: 10.1093/jac/dkv170.
 15. Wenzler E., Gotfried M. H., Loutit J. S., Durso S., Griffith D. C., Dudley M. N., Rodvold K. A. Meropenem-RPX7009 Concentrations in Plasma, Epithelial Lining Fluid, and Alveolar Macrophages of Healthy Adult Subjects. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59 (12): 7232–7239. doi: 10.1128/AAC.01713-15.
 16. Strukova E. N., Golikova M. V., Dovzhenko S. A., Kobrin M. B., Zinner S. H. Pharmacodynamics of doripenem alone and in combination with relebactam in an *in vitro* hollow-fiber dynamic model: emergence of resistance of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and the inoculum effect. Antibiotics. 2023; 12 (12): 1705. doi: 10.3390/antibiotics12121705.
 17. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing — EUCAST [Internet] [cited 2024 July 30]. Available from <https://www.eucast.org/publications-and-documents/rd>
 18. Mouton R. P., Brown D. E., Apfalter P., Cantón R., Giske C. G., Ivanova M., MacGowan A. P., Rodloff A., Soussy C. J., Steinbakk M., Kahlmeter G. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. Clin Microbiol Infect. 2012; 18 (3): E37–45. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03752.x.
 19. Tam V. H., Abodakpi H., Wang W., Ledesma K. R., Merlau P. R., Chan K., Altman R., Tran T. T., Nikolaou M., Sofjan A. K. Optimizing pharmacokinetics/pharmacodynamics of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations against high inocula of ESBL-producing bacteria. J Antimicrob Chemother. 2021; 76: 179–183. doi: 10.1093/jac/dkaa412.
 20. Tam V. H., Merlau P. R., Hudson C. S., Kline E. G., Eales B. M., Smith J., Sofjan A. K., Shields R. K. Optimal ceftazidime/avibactam dosing exposure against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2022; 28; 77 (11): 3130–3137. doi: 10.1093/jac/dkac294.
 21. Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 2003. 52 (1). 11–17. doi: 10.1093/jac/dkg269.
 22. Firsov A. A., Alieva K. N., Strukova E. N., Golikova M. V., Portnoy Y. A., Dovzhenko S. A., Kobrin M. B., Romanov A. V., Edelstein M. V., Zinner S. H. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to linezolid in an *in vitro* dynamic model. J Antimicrob Chemother. 2017; 1; 72 (11): 3100–3107. doi: 10.1093/jac/dkx249.
 23. 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. 200; 47 (5): 1604–1613. doi: 10.1128/AAC.47.5.1604-1613.2003.
 24. 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 (6): 1185–1192. doi: 10.1093/jac/dkl387.
 25. Alieva K. N., Golikova M. V., Dovzhenko S. A., Kobrin M. B., Strukova E. N., Ageevets V. A., Avdeeva A. A., Sulian O. S., Sidorenko S. V., Zinner S. H. Testing the mutant selection window hypothesis with meropenem: In vitro model study with OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. PLoS One. 2023; 4; 18 (8): e0288660. doi: 10.1371/journal.pone.0288660.
 26. Zhang B., Gu X., Li Y., Li X., Gu M., Zhang N., Shen X., Ding H. *In vivo* evaluation of mutant selection window of cefquinome against *Escherichia coli* in piglet tissue-cage model. BMC Vet Res. 2014; 16 (10): 297. doi: 10.1186/s12917-014-0297-1.
 27. Li X., Wang L., Zhang X. J., Yang Y., Gong W. T., Xu B., Zhu Y. Q., Liu W. Evaluation of meropenem regimens suppressing emergence of resistance in *Acinetobacter baumannii* with human simulated exposure in an *in vitro* intravenous-infusion hollow-fiber infection model. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58 (11): 6773–6781. doi: 10.1128/AAC.03505-14.
 28. Feng K., Jia N., Zhu P., Sy S., Liu Y., Dong D., Zhu S., Zhang J., Liu Y., Martins F. S., Gong H., Lv Z., Yu M., Sy S. K. B., Zhu Y. Aztreonam/avibactam effect on pharmacodynamic indices for mutant selection of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harbouring serine and New Delhi metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2021; 11; 76 (11): 2875–2883. doi: 10.1093/jac/dkab292.

Поступила / Received 06.08.2024

Принята в печать / Accepted 04.09.2024

Информация об авторах

Струкова Елена Николаевна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5391-1137. ResearcherID: C-9446-2015. Scopus Author ID: 24336721100. eLibrary SPIN-код: 9693-7240

Голикова Мария Владимировна — к. б. н., зав. лабораторией фармакокинетики и фармакодинамики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-7588-1733. Researcher ID: O-7873-2016. eLibrary SPIN-код: 9078-4922. Scopus Author ID: 56497807500

Кобрин Михаил Борисович — старший научный сотрудник лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2917-9249. Scopus Author ID: 7003801263

Довженко Светлана Анатольевна — к. х. н., старший научный сотрудник лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-7045-7917. Scopus Author ID: 6602290196

About the authors

Elena N. Strukova — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5391-1137. ResearcherID: C-9446-2015. Scopus Author ID: 24336721100. eLibrary SPIN-code: 9693-7240

Maria V. Golikova — Ph. D. in Biology, Head of Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-7588-1733. Researcher ID: O-7873-2016. eLibrary SPIN-code: 9078-4922. Scopus Author ID: 56497807500

Mikhail B. Kobrin — Senior Researcher at the Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2917-9249. Scopus Author ID: 7003801263

Svetlana A. Dovzhenko — Ph. D. in Chemistry, Senior Researcher, Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-7045-7917. Scopus Author ID: 6602290196

Гольшикин Александр Владимирович — младший научный сотрудник лаборатории биосинтеза биологически активных веществ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-3645-1933. Scopus Author ID: 56406498400

Альмяшева Наиля Рафиковна — младший научный сотрудник лаборатории биосинтеза биологически активных веществ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9575-1701, Scopus Author ID: 56406547700

Портной Юрий Абрамович — старший научный сотрудник лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9588-7876. Scopus Author ID: 6602151494

Alexandr V. Golyshkin — Junior Researcher at the Laboratory of Biosynthesis of Biologically Active Substances, Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-3645-1933. Scopus Author ID: 56406498400

Nailya R. Almyasheva — Junior Researcher at the Laboratory of Biosynthesis of Biologically Active Substances, Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9575-1701, Scopus Author ID: 56406547700

Yury A. Portnoy — Senior Researcher at the Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9588-7876. Scopus Author ID: 6602151494

Изучение безопасности и токсикокинетических параметров лекарственного препарата Эладис® в доклинических исследованиях с многократным введением

А. А. МАТИЧИН¹, М. В. МИРОШНИКОВ¹, А. А. МАТИЧИНА¹, В. М. КОСМАН¹,
М. В. КАРЛИНА¹, Е. М. ПЕТРОВА¹, А. А. ГЛОБЕНКО², Е. А. ДЖАЙН²,
А. В. КАПАШИН², А. Л. ВЛАДЫКИН², А. С. КОЛОСОВ², *М. А. ПАСЬКО²

¹ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский район, г. п. Кузьмоловский, Россия

² АО «Валента Фарм», Москва, Россия

Резюме

Кашель является одной из наиболее частых причин первичного обращения за медицинской помощью. Кашель отмечается у 40–50% пациентов с вирусной инфекцией дыхательных путей. Для пациентов с кашлем доступны препараты, блокирующие передачу сигнала на уровне центрального или периферического звеньев рефлекторной дуги, муколитические и отхаркивающие средства. АО «Валента Фарм» разработало инновационный лекарственный препарат Эладис®, таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 20 мг и 40 мг, предназначенный для лечения кашля у пациентов на фоне острой респираторной инфекции. Целью настоящей работы являлось изучение профиля безопасности и токсикокинетики разработанного препарата при многократном введении. В исследовании, проведённом на половозрелых кроликах, препарат вводился перорально в дозе 1, 3 или 6 таблеток/животное на протяжении 28 дней, что соответствовало 13,3, 40 и 80 мг/кг. Клиническая картина интоксикации у кроликов отсутствовала во всех исследованных дозах. Для оценки параметров токсикокинетики производился отбор крови из краевой вены уха после 1-го и 28-го дней введения. Как при однократном, так при многократном 28-дневном введении препарата наблюдалось статистически значимое увеличение показателей C_{max} и AUC_{0-24} на фоне увеличения вводимой дозы. Кумуляции препарата при многократном введении к 28-му дню исследования не наблюдалось. В исследовании на неполовозрелых крысах исследуемый препарат вводился внутривенно в течение 30 дней в дозах 11,8, 118 и 236 мг/кг. Результаты исследования показали отсутствие значимого влияния препарата на прирост массы тела, поведение животных в батарее функциональных тестов, а также оцениваемые физиологические, биохимические и гематологические параметры. Препарат не обладал местнораздражающим и иммунотоксическим действием, не оказывал влияния на сперматогенез.

Ключевые слова: кашель; Эладис®; безопасность; токсичность; токсикокинетика

Для цитирования: Матичин А. А., Мирошников М. В., Матичина А. А., Косман В. М., Карлина М. В., Петрова Е. М., Глобенко А. А., Джайн Е. А., Капашин А. В., Владыкин А. Л., Колосов А. С., Пасько М. А. Изучение безопасности и токсикокинетических параметров лекарственного препарата Эладис® в доклинических исследованиях с многократным введением. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 41–48. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-41-48>. EDN: XFITEE.

Study of the Safety and Toxicokinetic Parameters of the Drug Eladis® in Preclinical Trials with Repeated Administration

ALEKSANDR A. MATICHIN¹, MIHAIL V. MIROSHNIKOV¹, ALENA A. MATICHINA¹,
VERA M. KOSMAN¹, MARINA V. KARLINA¹, ELIZAVETA M. PETROVA¹,
ALEXANDER A. GLOBENKO², EKATERINA A. JAIN², ALEKSEY V. KAPASHIN²,
ALEXANDER L. VLADYKIN², ANDREY S. KOLOSOV², *MAKSIM A. PASKO²

¹ RMC «HOME OF PHARMACY», Leningrad region, Vsevolozhsk district, p. Kuzmolovsky, Russia

² A Valenta Pharm JSC, Moscow, Russia

Abstract

Cough is one of the most common reasons for initial visits to healthcare providers, affecting 40–50% of patients with viral respiratory tract infections. Treatment options for cough include medications that block signal transmission at the central or peripheral level of the reflex arc, as well as mucolytic and expectorant agents. Valenta Pharm JSC has developed an innovative drug, Eladis® (film-coated tablets, 20 mg and 40 mg), intended for the treatment of cough in patients with acute res-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: Maksim.Pasko@valentapharm.com



*Correspondence to:
E-mail: Maksim.Pasko@valentapharm.com

EDN: XFITEE



piratory infections. The aim of the present study was to assess the safety profile and toxicokinetic parameters of the drug after repeated administrations. In the study conducted on mature rabbits, the drug was administered orally at doses of 1, 3, or 6 tablets/animal over 28 days, corresponding to 13.3, 40, and 80 mg/kg, respectively. No signs of intoxication were observed in any of the experimental groups. To evaluate toxicokinetic parameters, blood samples were collected from the marginal ear vein after the 1st and 28th days of administration. Both single and multiple (28-day) administrations of the drug showed a statistically significant increase in C_{max} and AUC_{0-24} with increasing doses. No drug accumulation was observed following repeated administration on day 28. In a separate study on juvenile rats, Eladis[®] was administered intragastrically for 30 days at doses of 11.8, 118, and 236 mg/kg. The results indicated no significant effects of the drug on body weight gain, animal behavior in a battery of functional tests, as well as the estimated physiological, biochemical, and hematological parameters. The drug demonstrated no local irritant or immunotoxic effects and had no impact on spermatogenesis.

Keywords: cough; Eladis[®]; safety; toxicity; toxicokinetics

For citation: Matichin A. A., Miroshnikov M. V., Matichina A. A., Kosman V. M., Karlina M. V., Petrova E. M., Globenko A. A., Jain E. A., Kapashin A. V., Vladykin A. L., Kolosov A. S., Pasko M. A. Study of the safety and toxicokinetic parameters of the drug Eladis[®] in preclinical trials with repeated administration. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 41–48. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-41-48>. EDN: XFITEE. (in Russian)

Введение

По данным ВОЗ острые респираторные инфекции (ОРИ) занимают ведущее место (90–95% случаев) в структуре инфекционных заболеваний. В России количество пациентов с ОРИ ежегодно составляет более 30 миллионов человек, а суммарный ущерб, связанный с лечением данных заболеваний, оценивается в 40 миллиардов рублей. В среднем на протяжении календарного года взрослый человек переносит от 2 до 4 эпизодов респираторной инфекции, тогда как у детей частота простудных заболеваний достигает 9 раз в год. Среди возбудителей острых респираторных инфекций наиболее часто выявляют риновирусы (25–40% от общего числа ОРВИ), коронавирусы, вирусы гриппа и парагриппа, а также представители атипичной бактериальной флоры — *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*. Реже встречаются респираторно-синцитиальный вирус, аденовирусы и реовирусы [1–4].

Одним из наиболее частых симптомов при ОРИ является кашель, который развивается в течение первых дней заболевания. Раздражение кашлевых рецепторов при воздействии на них механических, химических или воспалительных факторов выступает в качестве начального звена для развития кашлевого рефлекса. При ОРИ кашель возникает за счёт стимуляции рецепторов ротоглотки, гортани и трахеобронхиального дерева, иннервация которых осуществляется волокнами блуждающего нерва. Концевые афферентные волокна блуждающего нерва возбуждаются при воздействии на них провоспалительных медиаторов, в том числе, в результате активации ионных каналов TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid subtype 1) и TRPA1 (Transient receptor potential ankyrin 1). Другим возможным механизмом развития кашля при ОРИ является раздражение механо- и хеморецепторов респираторного тракта на фоне образования избыточного количества мокроты, которая является продуктом экссудативного воспаления. При этом даже при эффективной эвакуации мокроты из нижних дыхатель-

ных путей на фоне терапии муколитиками, может продолжаться стимуляция позывов к кашлю при участии механизмов ларингеальной гиперреактивности. По афферентным путям импульсы, формирующие позывы к кашлю, поступают в продолговатый мозг, а оттуда передаются дыхательной мускулатуре, замыкая таким образом дугу кашлевого рефлекса [4–7].

Продолжительность кашля при ОРИ в среднем составляет от 7 до 9 дней. При этом нередко кашель приобретает патологический (неадаптивный) характер, не связанный с механическим удалением избытка мокроты. Такой кашель развивается на фоне нарастающего воспалительного процесса и стимулируется выработкой провоспалительных медиаторов разных групп, включая продукты дегрануляции эозинофилов. В этом случае кашель перестаёт выполнять свою защитную функцию и становится патологическим симптомом, который значительно снижает качество жизни пациентов [7, 8].

АО «Валента Фарм» разработало инновационный препарат Эладис[®], таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 20 мг и 40 мг, действующим веществом которого является N-[2-(1H-Имидазол-4-ил)-этил]-6-оксо-дельта-лактам (ХС8). Проведённые исследования показали, что механизм действия препарата Эладис[®] реализуется за счёт ингибирования гольджи-резидентной глутаминилциклазы человека, в результате чего происходит снижение активации хемокинов семейства MCP (Monocyte chemoattractant protein). Также в рамках разработки препарата было показано, что при его введении подавляется активация ионных каналов TRPA1 на периферии рефлекторной дуги кашлевого рефлекса. Таким образом, препарат оказывает комплексное противовоспалительное действие, а также снижает чувствительность волокон блуждающего нерва при формировании кашлевого рефлекса, препятствуя формированию кашлевой гиперчувствительности.

В данной статье представлена информация о доклинических токсикологических исследова-

ниях препарата Эладис® при его многократном введении, проведена оценка его токсикокинетики и изучено влияние на половозрелых животных.

Материал и методы

Представленные исследования были проведены в соответствии с принципами GLP (Good laboratory practice), а также согласно Федеральному закону № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», национальному ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и Решению Совета Евразийской Экономической Комиссии № 81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза». Проведение исследований было одобрено членами биоэтических комиссий (БЭК) исследовательских центров (протоколы заседаний БЭК № 1.19/22 и 3.19/22 от 13.05.2022 г., № 19-22 от 10.11.2022 г.)

Изучение токсикологического профиля и токсикокинетики при многократном введении препарата половозрелым кроликам. Изучение токсического действия и токсикокинетики лекарственного препарата Эладис®, таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 40 мг проводили на кроликах породы советская шиншилла. Возраст животных на момент начала эксперимента составил 14–16 нед., масса самцов — 2336–3326 г, самок — 2440–3268 г. В исследование было включено 80 животных, которые были распределены в 4 группы по 20 особей (10 самок и 10 самцов) в каждой: группа 1 являлась контрольной (животные не получали терапии); группа 2 — животным вводили исследуемый препарат в количестве 1 таблетка/животное, что соответствовало дозе 13,3 мг/кг при пересчёте на кролика массой 3 кг (10 терапевтических доз [ТД], из расчёта приёма человеком дозы 80 мг в сутки); группа 3 — животные получали исследуемый препарат в количестве 3 таблетки/животное, что соответствовало дозе 40 мг/кг (~30 ТД); животные из группы 4 получали исследуемый препарат в количестве 6 таблеток/животное, что соответствовало дозе 80 мг/кг (~60 ТД).

Исследуемый препарат вводили перорально без разрушения лекарственной формы на протяжении 28 дней. Ежедневно проводили клинический осмотр (оценивалось поведение животных, состояния кожи, шерстяного покрова, состояние слизистых оболочек, тонус мускулатуры, дыхание, диурез, реакции на раздражители); еженедельно оценивалась динамика массы тела; на 27-й и 55-й дни эксперимента регистрировали данные электрокардиограммы (ЭКГ), измеряли частоту сердечных сокращений (ЧСС), дыхательных движений (ЧДД) и артериальное давление (АД). Офтальмологический осмотр выполняли в 1-й день эксперимента (перед введением исследуемого препарата у всех животных), а также на 26-й и 54-й дни исследования. Взятие крови для оценки гематологического анализа (количество эритроцитов, средний объём эритроцитов, ширина распределения эритроцитов по объёму, уровень гемоглобина, гематокрит, лейкоцитарная формула, количество тромбоцитов, тромбоцит, ширина распределения тромбоцитов по объёму), биохимических показателей (АЛТ, АСТ, ЩФ, креатинин, мочевины, общий холестерин, триглицериды, общий билирубин, глюкоза, общий белок, альбумин, глобулин, отношение альбумины/глобулины), кислотно-основного состояния крови (рН, рСО₂, рО₂, sO₂, Na⁺, K⁺) и гемостаза (протромбиновое время и АЧТВ) проводилось на 28-й и 56-й дни эксперимента. Сбор образцов мочи для общего (рН, относительная плотность, белок, глюкоза, билирубин, уробилиноген, эритроциты, нитриты) и биохимического (мочевина и креатинин) анализов проводился на 29-й и 57-й дни эксперимента. На 29-й день исследования проводили эвтаназию 10 животных из каждой группы (по 5 самок и самцов), после чего выполняли патоморфологическое исследование внутренних органов. Оставшихся животных наблюдали в периоде восстановления и эвтаназировали на 57-й день от начала введения исследуемого препарата.

Для проведения токсикокинетического исследования в 1-й и 28-й дни введения исследуемого препарата производили отбор образцов крови из краевой вены уха кроликов. Объём отбираемой крови составил 2 мл для каждой временной точки: 0 (до введения), через 0,25 ч, 0,5 ч, 0,75 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 8 ч и 24 ч после введения препарата. Определение концентрации N-[2-(1H-Имидазол-4-ил)-этил]-6-оксо-дельта-лактама, действующего вещества препарата Эладис®, в биологических образцах проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность; нижний предел количественного определения (НПКО); калибровочный диапазон; правильность (точность); прецизионность и стабильность аналита. Калибровочный диапазон валидированной методики составил от 50,45 до 1210,8 нг/мл. На основании полученных данных рассчитывали следующие фармакокинетические параметры: C_{max} — максимальная концентрация, T_{max} — время достижения максимальной концентрации, T_{1/2} — период полувыведения, AUC_{0–24} — площадь под кривой «концентрация–время» от начальной точки измерения до 24 ч, MRT — среднее время пребывания исследуемого соединения в организме. Статистический анализ проводили при помощи лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism 9, GraphPad Software, США.

Изучение токсикологического профиля при многократном введении препарата половозрелым крысам. Исследование проводили на нелинейных белых крысах в возрасте 4 нед. и массой 96–130 г на момент начала эксперимента. Общее количество животных составило 100 голов (50 самцов и 50 самок), которые были распределены в 5 групп по 20 животных (10 самцов и 10 самок в каждой) в зависимости от получаемой терапии: 1-я группа (интактная) — животные не получали исследуемый препарат или плацебо; 2-я группа (контрольная) — животным внутривенно вводили 1% раствор крахмала в объёме 2,36 мл/кг; 3-я группа — животным внутривенно вводили исследуемый препарат в дозе 11,8 мг/кг (1 ТД); 4-я группа — животным внутривенно вводили исследуемый препарат в дозе 118 мг/кг (10 ТД); 5-я группа — животным внутривенно вводили исследуемый препарат в дозе 236 мг/кг (20 ТД). В качестве отправной точки для расчёта экспериментальных доз для животных, принималась терапевтическая доза, которая планируется к использованию в детской популяции пациентов и составляет 2 мг/кг. Для оценки безопасности исследуемый препарат был произведён в лекарственной форме таблетки, покрытые плёночной оболочкой с дозировкой 20 мг, которая предполагается для использования в педиатрической популяции. Перед введением таблетки измельчали до состояния порошка, после чего растворяли в растворе 1% крахмала. Препарат вводился ежедневно на протяжении 30 дней.

Ежедневно проводили клинический осмотр, оценивали общее состояние животных, двигательную активность, тонус скелетных мышц, состояние волосяного, кожного покрова и видимых слизистых оболочек. Массу тела измеряли до введения препарата и далее 1 раз в 3 дня до проведения эвтаназии. Также проводили измерение ректальной температуры, учёт количества потребляемого корма, оценивали данные модифицированной батареи функциональных тестов Ирвина, силу хвата, а также активность животных в тесте «Открытое поле». Эвтаназию проводили на 31-й (основные группы — по 5 самцов и 5 самок из каждой группы) и 45-й (оставленные группы) дни эксперимента. Измерение артериального давления, ЧДД и общий анализ мочи проводили на 4-й и 6-й неделе после начала введения препарата. Исследование гематологического и биохимического анализов крови, показателей гемостаза и ЭКГ выполняли на 5-й и 7-й неделе от начала эксперимента.

Макроскопическое исследование внутренних органов проводили у всех животных, подвергнутых эвтаназии. Гистологическое исследование проводилось у животных интактной

Токсикокинетические параметры препарата Эладис®
Toxicokinetic parameters of Eladis®

Доза, таблетки/животное	C_{\max} , нг/мл	T_{\max} , ч	AUC_{0-24} , ч×нг/мл	MRT, ч	$T_{1/2}$, ч
1-е введение					
1	5597±2095	0,83±0,17	10887±4260	1,78±0,41	0,86±0,25
3	18555±5989	0,85±0,27	40995±9678	2,48±0,92	1,11±0,34
6	32776±15396	0,73±0,25	84345±28188	2,82±0,79	1,38±0,67
28-е введение					
1	6001±1242	0,68±0,17	12722±2485	2,02±0,51	0,92±0,18
3	16132±7859	1,10±1,05	34410±14150	1,99±0,74	0,82±0,30
6	34471±11246	0,85±0,1	84255±26357	2,25±0,25	0,91±0,09

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. C_{\max} — максимальная плазменная концентрация; t_{\max} — время достижения максимальной плазменной концентрации; AUC_{0-24} — площадь под кривой «плазменная концентрация – время» с момента приёма лекарственного препарата до 24 ч; MRT — среднее время удержания действующего вещества в плазме крови; $t_{1/2}$ — период полувыведения вещества из плазмы крови.

Note. Data are presented as mean ± standard deviation. C_{\max} — maximum plasma concentration; t_{\max} — time to reach maximum plasma concentration; AUC_{0-24} — area under the plasma concentration–time curve from the moment of drug administration to 24 hours; MRT — mean retention time of the active substance in blood plasma; $t_{1/2}$ — half-life of the substance in blood plasma.

группы, а также группы, получавшей исследуемый препарат в максимальной дозе 236 мг/кг и подвергнутых эвтаназии на 31-й день эксперимента. Влияние исследуемого препарата на сперматогенез оценивали при гистологическом исследовании семенников на основании расчёта индекса сперматогенеза, подсчёта количества канальцев с 12-й стадией мейоза, количества канальцев со слущенным сперматогенным эпителием, а также среднего количества нормальных сперматогоний в канальце. Для оценки иммунотоксического действия определяли общее и абсолютное количество лейкоцитов в крови, измеряли массу иммунокомпетентных органов (тимус, селезёнка), проводили гистологическое исследование подчелюстного и каудального желудочного лимфоузлов, оценивали уровень глобулинов в периферической крови, а также рассчитывали соотношение глобулины/альбумины.

Статистическая обработка данных выполнена при помощи программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и программного пакета Statistica 10 (StatSoft, США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Изучение токсикологического профиля и токсикокинетики при многократном введении препарата половозрелым кроликам

Оценка токсикологического профиля. При пероральном введении препарата на протяжении 28 дней клинические признаки интоксикации отсутствовали во всех группах. Не отмечалось изменений во внешнем виде, поведении и данных клинико-лабораторных анализов. У всех животных наблюдался статистически значимый прирост массы тела с 15-го дня эксперимента по 29-й день. Во время проведения исследования было зарегистрировано 3 случая гибели животных. У кролика, получавшего исследуемый препарат в дозе 1 таблетка/животное (10 ТД) развилась флегмона в области правого бедра, которая привела к септическому процессу и гибели. В группе введения исследуемого препарата в дозе 3 таблетки/животное (30 ТД) летальные исходы зафиксированы у 2

животных. У одного из них непосредственной причиной смерти являлась острая сердечная недостаточность, у другого — дыхательная недостаточность на фоне двусторонней абсцедирующей пневмонии. В группе животных, получавших препарат в максимальной дозе 6 таблеток/животное (60 ТД), гибели не отмечалось. Патоморфологическое исследование внутренних органов не выявило различий между контрольной и экспериментальными группами животных.

Оценка токсикокинетики. После введения исследуемого препарата Эладис® действующее вещество (N-[2-(1H-Имидазол-4-ил)-этил]-6-оксо-дельта-лактam) определялось в плазме крови у большинства животных уже в первой временной точке (15 мин), что свидетельствует о достаточно быстрой абсорбции препарата. Максимальная концентрация достигалась через 0,5–1 ч после введения препарата, а через 24 ч после введения практически во всех пробах концентрация была ниже уровня НПКО (50,45 нг/мл). Токсикокинетические параметры препарата Эладис® представлены в таблице, а кривые зависимости «концентрация–время» после однократного (1-й день) и многократного введения (28-й день) — на рис. 1, 2.

Диапазон средних максимальных концентраций препарата Эладис® при многократном введении исследованного препарата в дозах 1, 3 и 6 таблеток/животное составил 6001–34471 нг/мл. Приведённые уровни концентраций не могут быть отнесены к токсичным, поскольку на фоне введения исследуемого препарата токсических проявлений не наблюдали. При увеличении дозы исследуемого препарата после однократного и многократного введения отмечалось статистически значимое (критерий Тьюки, $p < 0,05$) увеличение показателей C_{\max} и AUC_{0-24} .

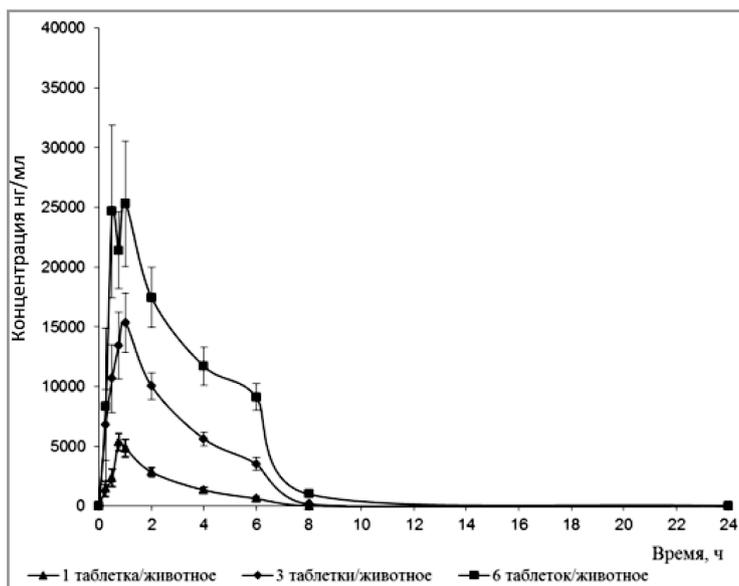


Рис. 1. Кривая «концентрация–время» после однократного перорального введения исследуемого препарата Эладис® в линейных координатах.

Fig. 1. Concentration–time curve after a single oral administration of the study drug Eladis® in linear coordinates.

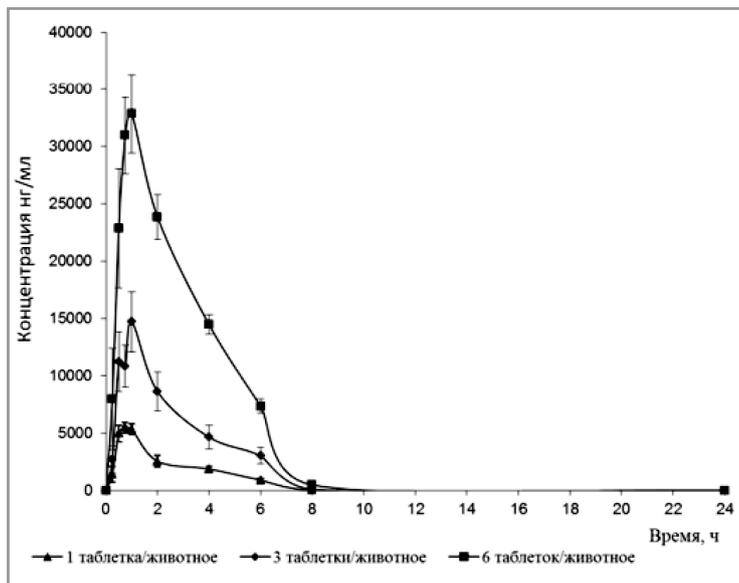


Рис. 2. Кривая «концентрация–время» после многократного перорального введения исследуемого препарата Эладис® в линейных координатах.

Fig. 2. Concentration–time curve after repeated oral administration of the study drug Eladis® in linear coordinates.

При сопоставлении токсикокинетических данных, полученных после однократного и многократного введения исследуемого препарата, статистически значимые различия наблюдали только для параметра MRT (критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$), а для остальных параметров отсутствовали.

Изучение токсикологического профиля при многократном введении препарата неполовозрелым крысам

В ходе проведения исследования случаев гибели животных не отмечалось. Ежедневный осмотр не выявил симптомов интоксикации. Анализ измерений температуры, потребления корма и воды у экспериментальных животных также не установил выраженных различий между группами. Все животные показали прирост массы тела без статистически значимых различий в сравнении с интактной группой.

При оценке модифицированной батареи тестов Ирвина и теста «Открытое поле» не было обнаружено выраженных различий в поведенческой активности между интактной, контрольной и опытными группами. Большинство исследуемых параметров соответствовало норме у всех экспериментальных животных. В ряде случаев отмечались статистически значимые различия, не имеющие дозовой зависимости и повторяемости у животных другого пола. Показатель силы хвата экспериментальных животных не различался между исследуемыми группами.

Оценка параметров ЭКГ, ЧДД и АД не выявила выраженных различий между исследуемыми группами.

У животных, эвтаназированных на 45-й день от начала введения исследуемого препарата, статистически значимых различий между всеми оцениваемыми параметрами не прослеживалось. Остальные наблюдаемые изменения в подавляющем большинстве случаев не имели дозовой зависимости и повторяемости у особей противоположного пола.

Патоморфологическое исследование внутренних органов не показало клинически значимых различий между интактной, контрольной и опытными группами. Гистологическая картина пищевода и желудка во всех случаях соответствовала норме, тем самым подтверждая отсутствие местнораздражающего действия у исследуемого препарата.

При патоморфологическом исследовании тимуса и селезенки структура, а также массовые коэффициенты органов соответствовали норме и не различались среди всех исследуемых групп. Гистологическая картина подчелюстного и каудального желудочного лимфоузлов также не выявила каких-либо изменений.

При гистологическом исследовании не отмечалось патологии со стороны сперматогенных клеток семенных канальцев и клеток Лейдига.

Обсуждение

Доклинические исследования токсичности с многократным введением проводятся с целью оценки влияния исследуемого препарата на различные параметры животных в течение продолжительного времени. Это позволяет выявить потенциальные органы-мишени, охарактеризовать взаимосвязь длительности введения и наблюдаемых реакций, а также оценить механизм токсического действия и обратимость токсических эффектов. Согласно Рекомендации Коллегии Евразийской Экономической Комиссии от 21.05.2020 г. № 10 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения», данные исследования должны проводиться на 2 видах млекопитающих, один из которых не относится к грызунам. Это повышает вероятность выявления видоспецифической токсичности, которая может проявляться только у некоторых видов животных и не встречаться среди других. Исследование токсикокинетики, как правило, проводится в рамках изучения токсичности при многократном введении и позволяет соотнести фармакокинетические параметры с безопасностью исследуемого препарата, что помогает в интерпретации полученных результатов [9–11].

В Решении Коллегии Евразийской Экономической Комиссии от 26.11.2019 г. № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов» указана минимальная продолжительность токсикологических исследований при повторном (многократном) введении в зависимости от предполагаемой длительности приёма лекарственного препарата в клинической практике. В рамках доклинической разработки лекарственного препарата Эладис®, таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 20 мг и 40 мг, АО «Валента Фарм» было проведено исследование по изучению токсических свойств и токсикокинетики на половозрелых кроликах, а также исследование токсичности на неполовозрелых крысах. Токсикологическое исследование на неполовозрелых крысах было выполнено в рамках расширения токсикологической программы исследований препарата Эладис® и проводилось с целью оценки возможных рисков со стороны безопасности при приёме препарата в педиатрической популяции пациентов. Основываясь на представленном нормативном документе, минимальная продолжительность токсикологических исследований при многократном введении препарата Эладис® должна составлять не менее 2 недель. В эксперименте на половозре-

лых кроликах период введения препарата составил 28 дней, а в исследовании на неполовозрелых крысах — 30 дней. Таким образом, длительность введения исследуемого препарата в 2 раза превышала минимально необходимые значения.

В исследовании на кроликах клиническая картина интоксикации отсутствовала, при этом не было выявлено специфических органов-мишеней для исследуемого препарата. В процессе проведения исследования отмечалась гибель 3 животных, которая была обусловлена патологией, не связанной с условиями проведения эксперимента. Анализ полученных данных показал отсутствие патогенетической связи между летальным исходом, приёмом препарата и картиной интоксикации. Это также подтверждается тем фактом, что среди кроликов, получивших максимальную дозу (6 таблеток/животное), гибели животных не отмечалось. Проведённое токсикокинетическое исследование продемонстрировало быструю абсорбцию препарата Эладис®, линейность его фармакокинетики, а также отсутствие эффекта кумуляции. Определяемые средние концентрации действующего вещества в плазме крови находились в диапазоне от 6001 до 34471 нг/мл и были отнесены к нетоксическим, так как в ходе эксперимента у животных не было отмечено признаков интоксикации.

В клиническом исследовании I фазы, проведённом на здоровых добровольцах, при приёме 1 таблетки препарата в дозе 40 мг, показатель C_{max} составил 593,7 нг/мл, а показатель AUC_{0-24} — 1146,46 ч·нг/мл. При сравнении средних значений концентрации и экспозиции препарата в плазме крови людей (1 таблетка) и кроликов (6 таблеток), можно отметить, что у животных наблюдается 55-кратное превышение по показателю C_{max} и более чем 70-кратное превышение по показателю AUC_{0-24} . При этом, вводимые животным дозы не оказали токсического эффекта, что свидетельствует о широком диапазоне безопасных доз препарата Эладис®.

В исследовании на неполовозрелых крысах ежедневный осмотр животных также не выявил признаков интоксикации. Анализ физиологических, гематологических и биохимических показателей не показал выраженных различий между исследуемыми группами. Препарат Эладис® не оказывал иммунотоксического действия и не обладал местнораздражающим действием в области введения (пищевод и желудок).

Заключение

В ходе проведённого исследования по изучению токсичности при многократном введении лекарственного препарата Эладис®, таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 20 мг и 40 мг

(АО «Валента Фарм») на половозрелых кроликах и неполовозрелых крысах в дозах, многократно превышающих терапевтические (60 ТД и 20 ТД соответственно), токсического действия препарата не отмечалось. Расчёт токсических доз в исследовании на неполовозрелых крысах, который производился на основании предполагаемой терапевтической дозы у детей, позволил оценить риски приёма препарата в детской популяции пациентов.

Результаты проведённых исследований не выявили специфических органов-мишеней. Исследуемый препарат не оказывал токсического влияния на сердечно-сосудистую, дыхательную, нервную, репродуктивную и иммунную системы, а также на лабораторные показатели крови, используемые для оценки состояния основных гомеостатических функций организма экспериментальных животных. Препарат не обладал местнораздражающим действием на органы желудочно-кишечного тракта. Таким образом, полученные результаты подтвердили благоприятный профиль безопасности разработанного

препарата, что позволило рекомендовать его для дальнейшего изучения в рамках клинических исследований у взрослых и детей.

Сравнение средних концентраций и экспозиции препарата при приёме однократной дозы здоровыми добровольцами и максимальной изучаемой токсической дозы (80 мг/кг) у кроликов показало 55-кратное превышение по показателю C_{max} и более чем 70-кратное превышение по показателю AUC_{0-24} . Отсутствие наблюдаемых токсических явлений у животных подтверждает благоприятный профиль безопасности разработанного препарата для применения во взрослой и детской популяции.

Конфликт интересов. Авторы статьи являются сотрудниками фармацевтической компании АО «Валента Фарм» и исследовательского центра АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», на базе которого проводились доклинические исследования. Статья опубликована при финансовой поддержке АО «Валента Фарм».

Литература/References

1. Зайцев А. А., Оквитый С. В. Кашель: дифференциальный диагноз и рациональная фармакотерапия. Терапевтический архив. 2014; 86 (12): 85–91. doi: <https://doi.org/10.17116/terarkh2014861285-91>. [Zaitsev A. A., Okovityi S. V. Cough: Differential diagnosis and rational pharmacotherapy. Therapeutic Archive. 2014; 86 (12): 85–91. doi: <https://doi.org/10.17116/terarkh2014861285-91> (in Russian)]
2. Вёрткин А. Л., Кнорринг Г. Ю. К вопросу терапии и профилактики гриппа, ОРВИ в новой эпидемиологической реальности. Поликлиника. 2023; 5: 24–27. [Vertkin A. L., Knorring G. Ju. On the issue of therapy and prevention of influenza, acute respiratory viral diseases in the new epidemic reality. Poliklinika. 2023; 5: 24–27. (in Russian)]
3. Зайцев А. А. Кашель: проблемы и решения. Практическая пульмонология. 2020; (2): 78–86. [Zaitsev A. A. Cough: Problems and Solutions. Practical Pulmonology. 2020; (2): 78–86. (in Russian)]
4. Лазарева Н. Б. Российские клинические рекомендации «Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) у взрослых» (2021): что нового для практикующего врача? Медицинский Совет. 2023; (4): 116–123. doi: <https://doi.org/10.21518/ms2022-033>. [Lazareva N. B. Russian clinical guidelines «Acute respiratory viral infections (ARVI) in adults» (2021): what's new for a practitioner? Meditsinskiy Sovet = Medical Council. 2023; (4): 116–123. doi: <https://doi.org/10.21518/ms2022-033> (in Russian)]
5. Орлова Н. В. Хронический кашель: дифференциальная диагностика и лечение. Медицинский Совет. 2020; (17): 124–131. doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2020-17-124-131>. [Orlova N. V. Chronic cough: differential diagnosis and treatment. Meditsinskiy Sovet =

- Medical Council. 2020; (17): 124–131. doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2020-17-124-131>. (in Russian)]
6. Romanova J., Rydlovskaya A., Mochalov S., Proskurina O., Gorokh Yu., Nebolsin V. The Effect of Anti-Chemokine Oral Drug XC8 on Cough Triggered by The Agonists of TRPA1 But Not TRPV1 Channels in Guinea Pigs. Pulmonary Therapy. 2022; 8 (1): 105–122. doi: [10.1007/s41030-022-00183-y](https://doi.org/10.1007/s41030-022-00183-y).
7. Zanas A., Fontana G. A., Mutolo D. Cough: pathophysiology, diagnosis and treatment. Springer. 2020. ISBN 978-3-030-48570-2. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-48571-9>.
8. Делягин В. М. Кашель: причины, дифференциальная диагностика, выбор противокашлевого средства. РМЖ. 2012; 20 (24): 1199–1202. [Delyagin V. M. Cough: causes, differential diagnosis, choice of antitussive agent. RMJ. 2012; 20 (24): 1199–1202. (in Russian)]
9. European Medical Agency. Guideline on repeated dose toxicity. 2010. Available on: <https://www.ema.europa.eu/en/repeated-dose-toxicity-scientific-guideline>.
10. Haschek W. M., Rousseaux C. G., Wallig M. A. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Third Edition. 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00021-2>.
11. Note for guidance on toxicokinetics: a guidance for assessing systemic exposure in toxicology studies (CPMP/ICH/384/95). Available on: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s-3-toxicokinetics-guidance-assessing-systemic-exposure-toxicology-studies-step-5_en.pdf

Поступила / Received 10.12.2024

Принята в печать / Accepted 15.12.2024

Информация об авторах

Матичин Александр Алексеевич — руководитель отдела специфической токсикологии и фармакодинамики АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский район, г. п. Кузьмоловский, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7478-4942

Мирошников Михаил Владимирович — к. м. н., руководитель отдела лабораторной диагностики АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский район, г. п. Кузьмоловский, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9828-3242

Матичина Алена Алексеевна — научный сотрудник отдела специфической токсикологии и фармакодинамики АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Все-

About the authors

Aleksandr A. Matichin — Head of the Department of Specific Toxicology and Pharmacodynamics, RMC «HOME OF PHARMACY», Leningrad region, Vsevolozhsk district, p. Kuzmolovskiy, Russian Federation. ORCID ID: 0000-0001-7478-4942

Mikhail V. Miroshnikov — Ph. D. in Medicine, Head of Laboratory Diagnostics Department, RMC «HOME OF PHARMACY» Leningrad region, Vsevolozhsk district, p. Kuzmolovskiy, Russian Federation. ORCID ID: 0000-0002-9828-3242

Alena A. Matichina — Research Officer of the Department of Specific Toxicology and Pharmacodynamics, RMC «HOME OF PHARMACY» Leningrad region, Vsevolozhsk district,

воложский район, г. п. Кузьмолловский, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2996-0748

Косман Вера Михайловна — к. фарм. н., руководитель химико-аналитической лаборатории, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский район, г. п. Кузьмолловский, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9690-1935

Карлина Марина Валерьевна — к. б. н., руководитель отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский район, г. п. Кузьмолловский, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6292-8934

Петрова Елизавета Михайловна — научный сотрудник химико-аналитической лаборатории, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский район, г. п. Кузьмолловский, Россия. ORCID ID: 0000-0003-1686-7541

Глобенко Александр Александрович — руководитель медицинского управления АО «Валента Фарм», Москва, Россия. SPIN-код: 8135-0575. ORCID ID: 0000-0001-9295-2663

Джайн Екатерина Александровна — к. фарм. н., руководитель группы доклинических исследований АО «Валента Фарм», Москва, Россия. SPIN-код: 4404-1997. ORCID ID: 0000-0003-0283-8598

Капашин Алексей Валерьевич — руководитель группы разработки и анализа документов клинических исследований и регистрационных досье АО «Валента Фарм», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9437-0322

Владыкин Александр Львович — к. б. н., руководитель управления по науке, медэкспертизе и поддержке бизнеса АО «Валента Фарм», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2511-2992

Колосов Андрей Сергеевич — менеджер группы доклинических исследований АО «Валента Фарм», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0938-5045

Пасько Максим Андреевич — к. м. н., специалист группы разработки и анализа документов клинических исследований и регистрационных досье АО «Валента Фарм», Москва, Россия. SPIN-код: 9153-0244. ORCID ID: 0000-0002-8518-3736

p. Kuzmolovsky, Russian Federation. ORCID ID: 0000-0002-2996-0748

Vera M. Kosman — Ph. D. in Pharmaceutical Sciences, Head of the Chemical-Analytical Laboratory, RMC «HOME OF PHARMACY» Leningrad region, Vsevolozhsk district, p. Kuzmolovsky, Russian Federation. ORCID ID: 0000-0001-9690-1935

Marina V. Karlina — Ph. D. in Biology, Head of the Department of Technology, Kinetics, and Analysis of Medicines RMC «HOME OF PHARMACY» Leningrad region, Vsevolozhsk district, p. Kuzmolovsky, Russian Federation. ORCID ID: 0000-0002-6292-8934

Elizaveta M. Petrova — Researcher of the Chemical-Analytical Laboratory, RMC «HOME OF PHARMACY» Leningrad region, Vsevolozhsk district, p. Kuzmolovsky, Russian Federation. ORCID ID: 0000-0003-1686-7541

Alexander A. Globenko — Head of the Medical Department, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation. SPIN code: 8135-0575. ORCID ID: 0000-0001-9295-2663

Ekaterina A. Jain — Ph. D. in Pharmaceutical Sciences, Head of the Preclinical Studies Group, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation. SPIN code: 4404-1997. ORCID ID: 0000-0003-0283-8598

Aleksey V. Kapashin — Head of the Group for Development and Analysis of the Clinical Trial Documents and Registration Dossiers, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation. ORCID ID: 0000-0002-9437-0322

Alexander L. Vladykin — Ph. D. in Biology, Head of the Department for Science, Medical Expertise, and Business Support, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation. ORCID ID: 0000-0003-2511-2992

Andrey S. Kolosov — Manager of the Preclinical Studies Group, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation. ORCID ID: 0000-0002-0938-5045

Maksim A. Pasko — Ph. D. in Medicine, Specialist of the Group for Development and Analysis of the Clinical Trial Documents and Registration Dossiers, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation. SPIN code: 9153-0244. ORCID ID: 0000-0002-8518-3736

Противовирусная активность препарата 5-хлорпиридин-3-ил-1H-индол-4-карбоксилата (AMND) в отношении возбудителя COVID-19

С. Я. ЛОГИНОВА¹, В. Н. ЩУКИНА¹, С. В. САВЕНКО¹, В. В. РУБЦОВ¹, Д. А. КУТАЕВ¹,
*С. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. А. КОВТУН², Н. И. МОСИН², М. М. МУРАДОВ², В. Л. ВОЛКОВ²,
А. С. БЕЛЯЕВ², А. Б. ПРЕДТЕЧЕНСКИЙ²

¹ ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия

² ФГБУ «27 Научный центр» Минобороны России, Москва, Россия

Резюме

Введение. Вирусное заболевание COVID-19 вызвало чрезвычайную ситуацию мирового масштаба. Быстрое и обширное распространение COVID-19, острая необходимость в этиотропных препаратах вызвали интерес к репозиционированию уже существующих лекарственных средств. Протеазы (Mpro) и папаин протеазы (PLpro) SARS-CoV протеазы были признаны привлекательными мишенями для разработки противовирусных агентов. **Цель работы** — оценка противовирусной эффективности индольных хлорпиридиновых эфиров в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*, а также в отношении экспериментальной формы COVID-19 у сирийских золотистых хомячков. **Материал и методы.** Эксперименты проводили на постоянной культуре клеток почки африканской зелёной марьяшки — Vero C1008. Эффективность препаратов оценивали по подавлению репродукции вируса *in vitro*. Биологическую активность оценивали титрованием вирусосодержащей суспензии в культуре клеток Vero C1008 по формированию негативных колоний. Использовали сирийских золотистых хомячков, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант В. Эффективность препарата оценивали по коэффициенту лечебного действия. **Результаты.** Изучена противовирусная эффективность индольных хлорпиридиновых эфиров, в отношении нового пандемического вируса SARS-CoV-2 в экспериментах *in vitro* в культуре клеток Vero C1008. Результаты исследования выявили, что препараты эффективно подавляют репродукцию вируса при внесении после инфицирования. В диапазоне концентраций 12,5–50,0 мкг/мл практически полностью подавляют репродукцию вируса SARS-CoV-2. По комплексу клинико-вирусологических, биохимических и гематологических показателей рассчитаны индекс тяжести течения заболевания (ИТЗ) и коэффициент лечебного действия (КЛД). Для AMND-1X-ИТЗ составил 0,635; КЛД — 36,5%; для AMND-10L-3-ИТЗ — 0,115; КЛД — 88,5%. **Заключение.** Из изученных соединений наиболее высокую противовирусную активность выявил препарат AMND-10L-3.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; Vero C1008; *in vitro*; противовирусная активность, культура клеток, коэффициент лечебного действия

Для цитирования: Логинова С. Я., Щукина В. Н., Савенко С. В., Рубцов В. В., Кутаев Д. А., Борисевич С. В., Ковтун В. А., Мосин Н. И., Мурадов М. М., Волков В. Л., Беляев А. С., Предтеченский А. Б. Противовирусная активность препарата 5-хлорпиридин-3-ил-1H-индол-4-карбоксилат (AMND) в отношении возбудителя COVID-19. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 49–58. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-49-58>. EDN: IXRLSM.

Antiviral Activity of 5-chloropyridin-3-yl-1h-indole-4-carboxylate (AMND) Against COVID-19

SVETLANA YA. LOGINOVA¹, VERONIKA N. SHCHUKINA¹, SERGEY V. SAVENKO¹,
VLADIMIR V. RUBTSOV¹, DMITRY A. KUTAYEV¹, *SERGEY V. BORISEVICH¹,
VIKTOR A. KOVTUN², NIKITA I. MOSIN², MIKHAIL M. MURADOV²,
VITALY L. VOLKOV², ARTUR S. BELYAEV², ALEXANDER B. PREDTECHENSKY²

¹ 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, *Sergiev Posad, Russia*

² 27th Science Center of the Ministry of Defence of the Russian Federation, *Moscow, Russia*

Abstract

Introduction. The viral disease COVID-19 has caused a global emergency. The rapid and widespread spread of COVID-19 and the urgent need for etiotropic drugs have sparked interest in repositioning existing drugs. SARS-CoV proteases (Mpro) and papain protease (PLpro) have been identified as attractive targets for the development of antiviral agents. **The aim of this work** was to evaluate the antiviral efficacy of indole chloropyridinyl ethers against the SARS-CoV-2 virus *in vitro*, as

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: sp_borisevich@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: sp_borisevich@mail.ru

EDN: IXRLSM



well as against the experimental form of COVID-19 in Syrian golden hamsters. *Material and methods.* The experiments were carried out on a permanent culture of African green monkey kidney cells — Vero C1008. The effectiveness of the drugs was assessed by suppressing the reproduction of the virus *in vitro*. Biological activity was assessed by titration of the virus-containing suspension in Vero C1008 cell culture by the formation of negative colonies. Syrian golden hamsters orally infected with the SARS-CoV-2 virus, variant B, were used. The effectiveness of the drug was assessed by the coefficient of therapeutic action. *Results.* The antiviral efficacy of indole chloropyridinyl ethers against the new pandemic virus SARS-CoV-2 was studied *in vitro* during experiments in Vero C1008 cell culture. The results of the study revealed that the drugs effectively suppress the reproduction of the virus when applied after infection. In the concentration range of 12.5–50.0 µg/ml, the drugs almost completely suppress the reproduction of the SARS-CoV-2 virus. According to the complex of clinical, virological, biochemical, and hematological indicators, the disease severity index (DSI) and the therapeutic action coefficient (TAC) were calculated. For AMND-1X — the DSI was 0.635; the TAC was 36.5%; for AMND-1OL-3 — the DSI was 0.115; the TAC was 88.5%. *Conclusion.* Of the studied compounds, the drug AMND-1OL-3 showed the highest antiviral activity.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; Vero C1008; *in vitro*; antiviral activity, cell culture, coefficient of therapeutic action

For citation: Loginova S. Ya., Schukina V.N., Savenko S. V., Rubtsov V.V., Kutayev D. A., Borisevich S. V., Kovtun V.A., Mosin N.I., Muradov M.M., Volkov V.L., Belyaev A. S., Predtechensky A. B. Antiviral activity of 5-chloropyridin-3-yl-1H-indole-4-carboxylate (AMND) against COVID-19. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (11–12): 49–58. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-49-58>. EDN: IXRLSM. (in Russian)

Введение

Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, возникла в Ухане (Китай) и унесла миллионы жизней по всему миру [1–3].

Стремительное распространение COVID-19 и острая необходимость в этиотропных препаратах вызвали интерес к репозиционированию уже существующих лекарственных средств. Проводятся исследования по тестированию существующих противовирусных препаратов широкого спектра действия с использованием стандартных анализов, которые были использованы для лечения других вирусных инфекций. Это интерфероны, индукторы интерферонов, а также химиопрепараты.

В то же время необходимы структурный дизайн, синтез и идентификация новых соединений, эффективных против SARS-CoV-2. После вспышек атипичной пневмонии и ближневосточного респираторного синдрома (SARS-CoV, MERS-CoV) в 2003 г. и в 2012 г., соответственно, большая часть усилия была посвящена дизайну, синтезу и идентификации небольших соединений, таких как ингибиторы основной протеазы (M_{pro}) и папаин протеазы (P_{Lpro}) SARS-CoV. Эти два фермента необходимы для репликации SARS-CoV, и обе протеазы были признаны привлекательными мишенями для разработки противовирусных агентов [4–9]. Основные протеазы как SARS-CoV-2, так и SARS-CoV имеют почти идентичные третичные структуры. В период с 2005 г. по 2009 г. были разработаны, синтезированы и идентифицированы ингибиторы M_{pro}, которые показали высокую активность в отношении SARS-CoV [10–15].

Основываясь на высокой структурной гомологии основной протеазы были протестированы соединения индольных хлорпиридиновых эфиров GRL-0820 и GRL-0920 в отношении SARS-CoV-2. Показано, что соединения GRL-0820 и GRL-0920 обладают мощной активностью против SARS-CoV-2, ковалентно связываются с M_{pro} вируса. Оценку активности концентраций двух индольных хлор-

пиридиновых эфиров GRL-0820 и GRL-0920 проводили в культуре клеток Vero E6. Значения 50% эффективной концентрации (EC₅₀) составили 15 и 2,8 мкМ, соответственно. GRL-0920 воспроизводимо и полностью блокировал инфекционность и цитопатический эффект SARS-CoV-2 [16]. GRL-0920 полностью блокировал инфекционность, репликацию и цитопатический эффект SARS-CoV-2 как в опытах с высокой, так и с низкой множественностью инфицирования.

Таким образом, соединения индольных хлорпиридиновых эфиров могут служить потенциальными терапевтическими средствами против COVID-19. Однако эффективность GRL-0920 является умеренной, и оптимизация имеет важное значение для разработки более мощных соединений против SARS-CoV-2 для лечения COVID-19.

Цель исследований — оценка противовирусной активности соединений индольных хлорпиридиновых эфиров: препарата 5-хлорпиридин-3-ил-1H-индол-4-карбоксилата (шифр AMND-1), гидрохлорид-5-хлорпиридин-3-ил-1H-индол-4-карбоксилата (шифр AMND-1X) и липосомальной формы 5-хлорпиридин-3-ил-1H-индол-4-карбоксилата (шифр AMND-1OL-3) в отношении возбудителя COVID-19.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус SARS-CoV-2, вариант В (Ухань), полученный в 2020 г. из ФГБУ ГНЦ ВБ «Вектор» (Роспотребнадзор), хранится в Государственной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

Культура клеток. В экспериментах использовали постоянную культуру клеток почки африканской зелёной мартовки — Vero C1008. В качестве ростовой и поддерживающей использовали среду Игла (MEM) на солевом растворе Хенкса, содержащую 7,5 и 2% фетальной телячьей сыворотки, соответственно.

Исследуемый препарат. 5-хлорпиридин-3-ил-1H-индол-4-карбоксилата AMND-1; гидрохлорид-5-хлорпиридин-3-ил-1H-индол-4-карбоксилата — AMND-1X и липосомальная форма 5-хлорпиридин-3-ил-1H-индол-4-карбоксилата — AMND-1OL-3.

Таблица 1. Рейтинговая оценка поражения лёгких, инфицированных животных
Table 1. Rating of lung damage in infected animals

Степень поражения, балл	Оценка, знак	Патологоанатомические изменения
0 (без поражения)	–	Лёгкие имеют нормальное анатомо-физиологическое состояние. Цвет лёгких бледно-розовый, сосудистый рисунок не выражен. Лёгкие по объёму и консистенции в норме, края органа ровные.
1 (лёгкая)	+	Лёгкие наполнены, в бронхиальной части сосуды расширены. Края верхних долей, как правило, ровные, серо-розового цвета. Нижние доли лёгких ровные, как правило, с серым оттенком. Сочетание нормальных участков без патологий (розовый цвет лёгких) и с патологическими очаговыми воспалительными изменениями (красно-серый цвет лёгких). Могут присутствовать мелкие (около 1 мм) геморрагические очажки. Лёгкие в большинстве случаев нормального объёма и консистенции.
2 (умеренная)	++	Среднеочаговая, редко крупноочаговая пневмония. По краям лёгкие имеют красно-серый оттенок. На вскрытии регистрируют средних размеров (2–3 мм) геморрагические очаги в обоих лёгких. Лёгкие отечны. Консистенция органа несколько дряблая, в некоторых случаях тестоватая.
3 (среднетяжёлая)	+++	Крупноочаговая, лобарная (долевая), сливная (в некоторых случаях множественная) полудолевая пневмония. Цвет патологических участков лёгких — насыщенный красный, либо вишнево-красный с грязно серым оттенком. Наблюдается выраженное поражение лёгких. Регистрируют геморрагии, как правило, среднего (2–3 мм) и крупного (более 3 мм) размера в обоих лёгких. Сосудистый рисунок патологически изменен. Консистенция тестоватая с лёгким уплотнением. Имеются признаки диффузного альвеолярного повреждения.

Лабораторные животные. В работе были использованы сирийские золотистые хомяки (массой 50–60 г), полученные из филиала «Столбовая» (Московская обл.) ФГБУН ИЦБМТ ФМБА России.

Клинический осмотр. Отклонения от физиологической нормы.

Масса тела. В процессе эксперимента контролировали ежедневно.

Эвтаназия. Умерщвление методом цервикальной дислокации на 3-и сут и 6-е сутки после заражения животных.

Макроскопический анализ лёгких. Макроскопическое исследование лёгких проводили при визуальном осмотре. Фиксировали следующие факторы: структура ткани, цвет, видимые повреждения и пр. (табл. 1).

Титрование вируса SARS-CoV-2. Оценка инфекционной активности вируса проводили в культуре клеток Vero Cl008 по формированию негативных колоний под агаровым покрытием.

Оценка противовирусной эффективности экспериментальных субстанций осуществлена в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России [17].

Критерии оценки тяжести течения инфекции у лабораторных животных рассматривают по показателям: клинико-вирусологическим (обнаружение вируса в лёгких, патологоанатомические изменения в лёгких инфицированных животных, поведение, внешний вид), биохимическим (активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, креатинкиназы, концентрации мочевины и креатинина), гематологическим (изменение элементов формулы крови).

Критерии оценки эффективности препарата: *in vivo* — коэффициент лечебного действия (КЛД) рассчитывают по совокупности клинико-вирусологических показателей (снижение уровня вирусной нагрузки в органе-мишени (лёгком), купирование патологоанатомических изменений в лёгких инфицированных животных; отсутствие внешних признаков заболевания в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России [17]), биохимических (активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, уровень

креатинина, мочевины в плазме крови животных), гематологических (изменение относительного количества форменных элементов крови). Все опыты на животных были проведены в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации — ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». *In vitro* — коэффициент ингибирования (КИ, %) формирования негативных колоний вирусом.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Полученные результаты представляли в виде среднего ± ошибка репрезентативности ($\bar{X} \pm \delta_x$) [18].

Результаты и обсуждение

При изучении противовирусной активности соединений оценивали их токсичность для культуры клеток Vero Cl008 и сирийских золотистых хомяков. В процессе исследования цитотоксичности соединения изучали влияние различных концентраций препарата на морфологию клеток и острую токсичность для животных по проявлению клинических признаков интоксикации. Результаты оценки токсичности исследуемых веществ представлены в табл. 2.

В 2 опытах исследуемые химические соединения (AMND-1 и AMND-1X) в концентрации 600 мкг/мл вызывали цитопатический эффект у 50% культур клеток, в 3-м опыте — в концентрации 1000 мкг/мл. В среднем максимально переносимая концентрация исследуемых образцов для культуры клеток Vero Cl008 составила 367 мкг/мл (расчёт по Ван дер Вардену) [18] (см. табл. 2).

Таблица 2. Оценка цитотоксичности химического соединения, шифр AMND, для культуры клеток Vero C1008
Table 2. Evaluation of the cytotoxicity of a chemical compound, code AMND, for Vero C1008 cell culture

Препарат	Токсическая концентрация препарата,			МПК, мкг/мл $\bar{X} \pm \delta_x$
	ЦПД ₅₀ , мкг/мл в опыте			
	№ 1	№ 2	№ 3	
AMND-1	600	600	№ 1000	367±115
AMND-1X	600	600	1000	367±115
Контроль среды	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	—
Контроль среды с 0,5% DMSO	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	—

Проведена оценка токсичности соединений AMND-1, AMND-1X при пероральном применении в дозе 400 мг/кг (химические соединения не растворимы в водных растворителях, поэтому применяли перорально в виде суспензии в 2% растворе крахмала) в течение 6 дней, однократно. Токсичность субстанции AMND-1OL-3 (липосомальная форма соединения AMND-1) изучали при внутрибрюшинном применении 16 мг/кг на животное, однократно.

Масса тела животных, которым вводили синтезированные химические препараты, на протяжении всего срока наблюдения статистически достоверно не отличалась от такового показателя для контрольных (плацебо) сирийских золотистых хомяков (с вероятностью 95%).

Поведение хомяков, принимавших исследуемые соединения, и интактных животных соответствовало физиологическому развитию. Гибель животных отсутствовала. Двигательная активность и аппетит опытной и контрольной групп не различались. Физиологической норме соответствовала упитанность, волосяной и кожный покров (волос блестящий, эластичный, хорошо удерживается в волосяной луковице). Кожный покров, цвет кожи не изменён. Слизистые глаз и рта блестящие, влажные, нормального цвета. Консистенция и форма экскрементов не изменены и соответствуют данному виду животных. Дыхание ровное, без хрипов. Следовательно, использованные схемы и дозы исследуемых соединений не токсичны для сирийских золотистых хомяков.

Проведена оценка эффективности химических соединений 5-хлорпиридин-3-ил-1Н-индол-4-карбоксилата (AMND-1) и гидрохлорид 5-хлорпиридин-3-ил-1Н-индол-4-карбоксилата (AMND-1X)

в культуре клеток Vero C1008 в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В (Ухань). Множественность инфицирования — 0,0001 БОЕ на клетку, 37°C в течение 60 мин. Схема внесения препаратов — через 1 ч после инфицирования.

Исследуемые соединения в широком диапазоне концентраций (12,5–50,0 мкг/мл) практически полностью подавляют инфекционную активность вируса SARS-CoV-2 (табл. 3).

Химические соединения AMND-1 и AMND-1X в широком диапазоне концентраций 6,3–50,0 мкг/мл эффективно подавляют репродукцию вируса в культуре клеток. Средняя величина ЕД₅₀ для соединения AMND-1 составила 4,79 мкг/мл; для AMND-1X — 5,33 мкг/мл при расчёте по методу Ван дер Вардена.

Изучение активности AMND-1, AMND-1X и AMND-1OL-3 в отношении экспериментальной формы COVID-19 у сирийских золотистых хомяков проводили по схеме экстренной профилактики и лечения. Схемы применения препаратов: экстренная профилактика — через 1 ч после инфицирования и далее 1 раз в сутки в течение 5 дней; лечение — через 8 ч (один цикл репродукции вируса) после инфицирования ударная (двойная) доза и далее 1 раз в сутки в течение 5 дней. Препараты применяли перорально.

Сирийских золотистых хомяков перорально инфицировали вирусом SARS-CoV-2, вариант В, в дозе 3×10⁵ БОЕ в 50 мкл. Наблюдение за инфицированными животными осуществляли в течение 6 дней. Через 3-и и 6-е сутки после инфицирования по 3 хомяка из каждой группы умерщвляли методом цервикальной дислокации.

В результате патологоанатомического обследования выявлено, что на пике развития инфек-

Таблица 3. Оценка влияния химиопрепаратов на репродукцию вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero C1008 (n=3)

Table 3. Evaluation of the effect of chemotherapy drugs on the reproduction of the SARS-CoV-2 virus in Vero C1008 cell culture (N=3)

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	Снижение накопления вируса, Δ, lg,	Коэффициент ингибирования, КИ, %, $\bar{X} \pm \delta_x$
AMND-1	50,0	7,54±0,030	100,00±0,002
	25,0	7,54±0,030	100,00±0,002
	12,5	3,30±0,140	99,97±0,010
	6,3	0,94±0,060	86,97±0,090
AMND-1X	50,0	6,05±0,360	99,99±0,003
	25,0	3,12±0,020	99,91±0,030
	12,5	1,35±0,050	95,52±0,450
	6,3	0,65±0,030	77,63±2,110

Таблица 4. Оценка уровня накопления вируса SARS-CoV-2 в лёгких сирийских золотистых хомяков при применении химических соединений

Table 4. Estimation of SARS-CoV-2 virus accumulation level in the lungs of Syrian golden hamsters using chemical compounds

Препарат	Суточная доза препарата, мг/кг	Уровень накопления вируса в лёгких после инфицирования, lg БОЕ/г, $\bar{X} \pm \sigma_x$		Снижение накопления вируса в лёгких после инфицирования, Δ , lg	
		3-и сутки	6-е сутки	3-и сутки	6-е сутки
AMND-1	400	5,80±0,02	4,38±0,04	отсутствует	отсутствует
AMND-1X	400	1,43±0,48	3,31±0,04	4,25	0,55
AMND-1OL-3	8	0,00±0,00	0,00±0,00	5,68	3,86
Контроль (без препарата)	—	5,68±0,03	3,86±0,07	—	—

ции (3-и сутки) исследуемые препараты не оказывают влияние на степень поражения лёгких (по сравнению с лёгкими хомяков, которые не принимали препараты).

Через 6 сут после инфицирования в ткани лёгких хомяков, принимавших препарат AMND-1, патологические изменения не выявлены; AMND-1OL-3 — у 66,7% патологические изменения не выявлены, у 33,3% выявлены патологические очаговые воспалительные изменения; AMND-1X — у 66,7% выявлены очаговые изменения, у 33,3% патологические изменения не выявлены.

Проведены сравнительные исследования по оценке уровня вирусной нагрузки в органе-мишени у животных, принимавших химиопрепараты, и контрольной группы. Инфекционный титр вируса в гомогенате лёгких оценивали методом негативных колоний в культуре клеток Vero C1008 под твёрдым агаровым покрытием.

Соединение AMND-1 при применении по схеме экстренной профилактики однократно в течение 6 дней в суточной дозе 400 мг/кг не выявило активности в подавлении вирусной нагрузки в органе-мишени в течение всего срока наблюдения. При применении соединения AMND-1X на 3-и сутки после инфицирования ингибирование репродукции в лёгких составило 99,0%, на 6-е сутки — 72,0% (табл. 4).

Применение липосомальной формы соединения AMND-1 (AMND-1OL-3) в дозе 8 мг/кг способствует полному ингибированию репродукции вируса в лёгких — коэффициент ингибирования составил 100% в течение всего срока наблюдения.

Проведён сравнительный анализ влияния вируса SARS-CoV-2 на изменения в лёгких сирийских золотистых хомяков, принимавших AMND-1OL-3 в различных дозах, при пероральном инфицировании в дозе 5,5 lg БОЕ на животное по сравнению с инфицированными нелечеными и интактными животными.

При применении AMND-1OL-3 по схеме экстренной профилактики в суточной дозе 8 мг/кг у 33,3% животных патологические изменения в лёгких не выявлены, у 66,7% — выявлены незначи-

тельные очаговые воспалительные изменения. При использовании препарата в дозе 4 мг/кг и 2 мг/кг патологические изменения в лёгких были более выраженными — у 100% животных отмечены патологические очаговые воспалительные изменения. При применении препарата AMND-1OL-3 по лечебной схеме у 33,3% животных отмечена среднеочаговая пневмония, выявлены геморрагические очаги средних размеров, консистенция органа тестоватая; у 66,7% — отмечены патологические очаговые воспалительные изменения. Подобные патологические изменения лёгких были отмечены в контрольной группе инфицированных сирийских золотистых хомяков.

На 6-е сутки после заражения статистически значимого различия поражения лёгких животных различных групп (экстренная профилактика) не наблюдали. В лечебной группе животных отмечено снижение степени поражения лёгочной ткани. В контрольной группе патологоанатомическая картина поражения лёгких у животных преимущественно характеризовалась развитием среднеочаговой пневмонии.

Таким образом, в результате проведённых патологоанатомических исследований выявлено, что наиболее тяжёлые формы поражения лёгких регистрируются у нелеченных сирийских хомяков при заражении вирусом SARS-CoV-2 в дозе 5,5 lg БОЕ на 6-е сутки после инфицирования.

При некропии опытных и контрольных групп сирийских золотистых хомяков было показано, что выделения из естественных отверстий отсутствовали. Не отмечено нарушений в положении и размерах внутренних органов. Величина и форма сердца были без изменений. Мышца сердца была умеренно плотной, коричневатой окраски. Форма и величина печени была без изменений. Ткань была умеренно полнокрвной. Размеры и форма селезёнки также были без изменений. Ткань селезёнки была умеренно плотной консистенции, тёмно-вишнёвого цвета.

Оценивали уровень накопления вируса в 10% суспензии гомогената лёгких инфицированных леченных и контрольных сирийских золотистых хомяков на 3-и и 6-е сутки после инфицирования.

Результаты оценки уровня инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в ткани лёгких представлены в табл. 5 и 6.

По данным трёх независимых опытов липосомальная форма химического соединения AMND-1OL-3 через 3-е суток после инфицирования при применении по схеме экстренной профилактики в дозе 8 мг/кг полностью подавляет размножение вируса в органе-мишени; в дозе 4 мг/кг — практически полностью подавляет размножение вируса в лёгких — на 99,996%; в дозе 2 мг/кг снижение накопления вируса составляет всего 35,3% (см. табл. 5).

При использовании соединения AMND-1OL-3 по схеме лечения (ударная доза через 8 ч после инфицирования 16 мг/кг и далее по 8 мг/кг в течение 5 дней) подавление репродукции вируса в лёгких на 3-и сутки после инфицирования отсутствовало.

По данным трёх независимых опытов липосомальная форма химического соединения AMND-1OL-3 через 6 сут после инфицирования при применении по схеме экстренной профилактики в дозе 8 мг/кг полностью подавляет размножение вируса в органе-мишени; в дозе 4 мг/кг — подавляет размножение вируса в лёгких на 61,8%; в дозе 2 мг/кг снижение накопления вируса составляет 61,2% (табл. 6).

При использовании соединения AMND-1OL-3 по схеме лечения (ударная доза через 8 ч после инфицирования 16 мг/кг и далее по 8 мг/кг в течение 5 дней) подавление репродукции вируса в лёгких составило 97,1%.

Таким образом, в результате проведённых исследований выявлено, что наиболее эффективно снижает накопление вируса в лёгких сирийских золотистых хомячков, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, липосомальная форма соединения AMND-1OL-3 при применении по схеме экстренной профилактики в дозах 8 мг/кг и 4 мг/кг. При применении препарата по лечебной схеме высокая эффективность выявлена в терминальной фазе наблюдения — 6-е сутки.

Проведён сравнительный анализ биохимических и гематологических показателей крови леченых и контрольных животных. Препараты AMND-1OL-3 и AMND-1X применяли перорально по схеме экстренной профилактики в суточной дозе 8 мг/кг и 400 мг/кг, соответственно. Для определения коэффициента лечебного действия провели оценку следующих показателей: вирусологические (степень поражения лёгкого, уровень вирусной нагрузки в лёгких), биохимические (активность аланин- и аспаратаминотрансферазы, креатинина, мочевины, креатинкиназы, лактатдегидрокиназы)

Таблица 5. Оценка уровня накопления вируса SARS-CoV-2 в лёгких сирийских золотистых хомячков при применении препарата через 3 сут после инфицирования
Table 5. Assessment of the level of accumulation of the SARS-CoV-2 virus in the lungs of Syrian golden hamsters when using the drug 3 days after infection

Препарат	Суточная доза препарата, мг/кг	Уровень накопления вируса в лёгких Ig БОЕ/г, $\bar{X} \pm \delta_x$	Снижение накопления вируса в лёгких, Δ , Ig, $\bar{X} \pm \delta_x$	Коэффициент ингибирования репродукции вируса, КИ, %, $\bar{X} \pm \delta_x$
AMND-1OL-3, экстренная профилактика	8	0,00±0,00	4,74±0,22	100,0±0,0
	4	0,10±0,00	4,64±0,72	99,996±0,01
	2	4,30±0,05	0,44±0,12	35,3±9,45
AMND-1OL-3, лечение	16/8	4,88±0,16	Отсутствует	0
Контроль (без препарата)	—	4,74±0,22	—	—

Таблица 6. Оценка уровня накопления вируса SARS-CoV-2 в лёгких сирийских золотистых хомячков при применении препарата через 6 суток после инфицирования
Table 6. Assessment of the level of accumulation of the SARS-CoV-2 virus in the lungs of Syrian golden hamsters when using the drug 6 days after infection

Препарат	Суточная доза препарата, мг/кг	Уровень накопления вируса в лёгких, $\bar{X} \pm \delta_x$	Снижение накопления вируса в лёгких, Δ , Ig, $\bar{X} \pm \delta_x$	Коэффициент ингибирования репродукции вируса, КИ, %, $\bar{X} \pm \delta_x$
AMND-1OL-3, экстренная профилактика	8	0,00±0,00	3,83±0,04	100,0±0,0
	4	3,07±0,40	0,76±0,38	61,8±30,46
	2	3,14±0,38	0,72±0,36	61,2±30,46
AMND-1OL-3, лечение	16/8	1,51±0,80	2,32±0,81	97,07±2,22
Контроль (без препарата)	—	3,83±0,04	—	—

и гематологических (уровень лейкоцитов, относительное количество лимфоцитов, соотношение сегменто- и палочкоядерных нейтрофилов, уровень молодых гранулоцитов).

Показано, что на 3-и сутки после инфицирования при экстренной профилактике препаратом AMND-1X статистически достоверных отличий от показателей крови интактных хомяков не выявлено. На 6-е и 10-е сутки после инфицирования отмечено статистически достоверное увеличение миелоцитов, появились юные гранулоциты, увеличилось количество палочкоядерных нейтрофилов, незначительное увеличение эозинофилов и моноцитов. Выявлено статистически достоверное снижение сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с показателями для интактных животных. При этом по сравнению с контрольной группой животных в крови леченых животных не отмечена лимфопения, и выявлен статистически более низкий уровень палочкоядерных нейтрофилов.

Для инфицированных животных показатель индекса интоксикации (ИИ) по Кальф–Калифу и индекс ядерного сдвига (ИЯС) на 3-и сутки после инфицирования составил — 0,31 и 1,63, соответственно; на 6-е сутки: ИИ — 0,29, ИЯС — 1,9; на 10-е сутки: ИИ — 0,37, ИЯС — 1,5; для интактных: ИИ — 0,18, ИЯС — 0,27; для принимавших AMND-1X на 3-и сутки после инфицирования: ИИ — 0,18; ИЯС — 0,22; на 6-е сутки: ИИ — 0,30, ИЯС — 0,78; на 10-е сутки: ИИ — 0,19, ИЯС — 0,50. Выявлено увеличение в крови количества мо-

дых форм нейтрофилов, что говорит о ядерном сдвиге влево. Выявлен реактивный сдвиг (увеличение в крови содержания палочкоядерных нейтрофилов, появление юных форм, появление миелоцитов) на 6-е и 10-е сутки наблюдения. Появление такого сдвига не является неблагоприятным фактором течения инфекционного процесса.

При применении препарата AMND-1OL-3 на протяжении всего срока наблюдения значимых отличий в показателях лейкоцитарной формулы крови по сравнению с интактными животными не выявлено. Выявлен низкий уровень молодых нейтрофилов сопоставимый с уровнем, характерным для интактных животных. Для принимавших AMND-1OL-3 на 3-и сутки после инфицирования: ИИ — 0,16; ИЯС — 0,21; на 6-е сутки: ИИ — 0,12, ИЯС — 0,23; на 10-е сутки: ИИ — 0,21, ИЯС — 0,16 и соответствуют показателям для интактных сирийских золотистых хомяков.

На протяжении всего срока наблюдения применение препаратов AMND-1X и AMND-1OL-3 способствовало нормализации биохимических показателей крови сирийских золотистых хомяков (табл. 7 и 8).

По результатам рейтинговой оценки комплекса показателей индекс тяжести заболевания контрольной группы животных составил 1,000, при применении препарата AMND-1X — 0,635; коэффициент лечебного действия — 36,5%. При применении препарата AMND-1OL-3 индекс тяжести заболевания составил 0,115; коэффициент лечебного действия — 88,5%.

Таблица 7. Результаты изучения влияния препарата AMND-1X на тяжесть течения экспериментальной формы COVID-19 у сирийских золотистых хомяков, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2

Table 7. Results of studying the effect of AMND-1X on the severity of the course of the experimental form of COVID-19 in Syrian golden hamsters orally infected with the SARS-CoV-2 virus

Показатель	До инфицирования	Контроль дозы инфицирования	Экстренная профилактика
Клинико-вирусологические показатели			
Накопление вируса в лёгких, Ig БОЕ/г, $X_{cp} \pm \sigma_x$	—	5,48±0,07	0
Степень поражения лёгких	—	2,0±0	0,7±0,3
Биохимические показатели			
Аланинаминотрансфераза, мМ/(ч×л)	0,33±0,17	0,86±0,23	2,06±0,52
Аспаратаминотрансфераза, мМ/(ч×л)	0,48±0,09	1,10±0,12	1,30±0,25
Лактатдегидрогеназа, Е/л	207,9±101,3	532,7±283,4	584,6±222,7
Креатинкиназа, Е/л	308,19±56,53	1303,21±46,61	153,89±16,88
Мочевина, мМ/л	5,94±0,11	8,00±0,17	8,40±0,63
Креатинин, мкМ/л	157,1±41,2	161,9±1,4	175,1±8,8
Гематологические показатели			
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	2,0±0,3	1,3±0,3	1,6±0,2
Миелоциты, %	0,3±0,3	3,7±0,3	3,3±1,3
Юные нейтрофилы, %	0,0±0,0	2,3±0,3	1,7±0,3
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,3±0,3	10,7±0,3	3,3±0,3
Сегментоядерные нейтрофилы, %	19,0±0,6	9,3±0,3	19,3±0,9
Эозинофилы, %	1,0±0,6	1,7±0,3	1,3±0,3
Моноциты, %	1,0±0,0	2,0±0,0	0,7±0,3
Базофилы, %	0,7±0,8	3,0±0,0	1,0±0
Лимфоциты, %	75±0,6	67,0±0,0	72,7±2,9

Таблица 8. Результаты изучения влияния препарата AMND-1OL-3 на тяжесть течения экспериментальной формы COVID-19 у сирийских золотистых хомяков, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2
Table 8. Results of studying the effect of AMND-1OL-3 on the severity of the course of the experimental form of COVID-19 in Syrian golden hamsters orally infected with the SARS-CoV-2 virus

Показатель	До инфицирования	Контроль дозы инфицирования	Экстренная профилактика
Клинико-вирусологические показатели			
Накопление вируса в лёгких, Ig БОЕ/г, $\bar{X}_{cp} \pm \sigma_x$	—	5,48±0,07	0
Степень поражения лёгких	—	2,0±0	0,6±0,1
Биохимические показатели			
Аланинаминотрансфераза, мМ/(ч·л)	0,33±0,17	0,86±0,23	0,35±0,17
Аспартатаминотрансфераза, мМ/(ч·л)	0,48±0,09	1,10±0,12	0,52±0,10
Лактатдегидрогеназа, Е/л	207,9±101,3	532,7±283,4	230,9±101,3
Креатинкиназа, Е/л	308,19±56,53	1303,21±46,61	310,19±56,53
Мочевина, мМ/л	5,94±0,11	8,00±0,17	6,00±0,10
Креатинин, мкМ/л	157,1±41,2	161,9±1,4	158,3±31,2
Гематологические показатели			
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	2,0±0,3	1,3±0,3	1,9±0,2
Миелоциты, %	0,3±0,3	3,7±0,3	0,0±0,0
Юные нейтрофилы, %	0,0±0,0	2,3±0,3	0,0±0,0
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,3±0,3	10,7±0,3	3,0±0,0
Сегментоядерные нейтрофилы, %	19,0±0,6	9,3±0,3	19,3±0,3
Эозинофилы, %	1,0±0,6	1,7±0,3	1,0±0,6
Моноциты, %	1,0±0,0	2,0±0,0	1,0±0,0
Базофилы, %	0,7±0,8	3,0±0,0	0,7±0,8
Лимфоциты, %	75±0,6	67,0±0,0	75,0±0,3

Заключение

В культуре клеток Vero C1008 соединения AMND-1 и AMND-1X в широком диапазоне концентраций (12,5–50,0 мкг/мл) практически полностью подавляют репродукцию вируса SARS-CoV-2, ХТИ составил 29,4.

Изучение активности препаратов AMND-1X и AMND-1OL-3 на сирийских золотистых хомяках, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант В, в дозе 5×10^5 БОЕ, показало, что применение AMND-1OL-3 оказывает высокую протективную эффективность.

По комплексу клинико-вирусологических, биохимических и гематологических показателей рассчитаны индекс тяжести течения заболевания (ИТЗ) и коэффициент лечебного действия (КЛД). Для AMND-1X: ИТЗ — 0,635; КЛД — 36,5%; для AMND-1OL-3: ИТЗ — 0,115; КЛД — 88,5%.

Препарат AMND-1 в липосомальной форме (AMND-1OL-3 AMND-1OL-3) выявил значительно большую протективную активность, чем в виде порошкообразной субстанции. Резюмируя изложенное можно заключить, что из всех изученных соединений высокую противовирусную активность выявил препарат AMND-1OL-3.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Логинова С. Я. — концепция и дизайн исследования, сбор данных литературы, написание текста, обработка материала, редактирование; Щукина В. Н. — сбор и обработка материала, статистический анализ; Савенко С. В. — сбор и обработка материала; Рубцов В. В. — сбор и обработка материала; Кутаев Д. А. — концепция исследования, написание текста; Борисевич С. В. — концепция исследования, написание текста, редактирование; Ковтун В. А. — редактирование; Мосин Н. И. — синтез препарата, редактирование; Мурадов М. М. — синтез препарата; Беляев А. С. — синтез препарата; Предтеченский А. Б. — сбор данных литературы.

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Contribution. Loginova S. Ya. — research concept and design, literature data collection, material collection and processing, text writing, text editing; Shchukina V. N. — material collection and processing, text writing, statistic analysis; Savenko S. V. — material collection and processing; Rubtsov V. V. — material collection and processing; Borisevich S. V. — text writing, text editing; Kutayev D. A. — research concept, text writing, Koptun V. A. — text editing, Mosin N. I. — drug synthesis, text editing, Muradov M. M. — drug synthesis, Belyaev A. S. — drug synthesis, Predtechensky A. B. — literature data collection.

Литература/References

- COVID-19 cases worldwide. <https://www.worldometers.info/coronavirus/>. Accessed on 29 Mar 2020.
- Guan W. J., Ni Z. Y., Hu Y. *et al.* Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020; 382 (18): 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
- Habibzadeh P., Stoneman E. K. The novel coronavirus: a bird's eye view. *Int J Occup Environ Med.* 2020; 11: 65–71. doi: 10.15171/ijoem.2020.1921.
- Jacobs J., Grum-Tokars V., Zhou Y. *et al.* Discovery, synthesis, and structure-based optimization of a series of N-(tert-butyl)-2-(N-arylamido)-2-(pyridin-3-yl) acetamides (ML188) as potent noncovalent small molecule inhibitors of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease. *J Med Chem.* 2013; 56: 534–546. doi: 10.1021/jm301580n.
- Xue X., Yu H., Yang H. *et al.* Structures of two coronavirus main proteases: implications for substrate binding and antiviral drug design. *J Virol.* 2008; 82: 2515–2527. doi: 10.1128/JVI.02114-07.
- Zhang J., Pettersson H. I., Huitema C. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of inhibitors for severe acute respiratory syndrome 3C-like protease based on phthalhydrazide ketones or heteroaromatic esters. *J Med Chem.* 2007; 50: 1850–1864. doi: 10.1021/jm061425k.
- Jain R. P., Pettersson H. I., Zhang J. *et al.* Synthesis and evaluation of keto-glutamine analogues as potent inhibitors of severe acute respiratory syndrome 3CLpro. *J Med Chem.* 2004; 47: 6113–6116. doi: 10.1021/jm0494873.
- Lee H., Lei H., Santarsiero B. D., Gatuz J. L. *et al.* Inhibitor recognition specificity of MERS-CoV papain-like protease may differ from that of SARS-CoV. *ACS Chem Biol.* 2015; 10: 1456–1465. doi: 10.1021/cb500917m.
- Lee H., Cao S., Hevener K. E. *et al.* Synergistic inhibitor binding to the papain-like protease of human SARS coronavirus: mechanistic and inhibitor design implications. *ChemMedChem.* 2013; 8: 1361–1372. doi: 10.1002/cmcd.201300134.
- Ghosh A. K., Takayama J., Aubin Y. *et al.* Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of a series of novel and reversible inhibitors for the severe acute respiratory syndrome-coronavirus papain-like protease. *J Med Chem.* 2009; 52: 5228–5240. doi: 10.1021/jm900611t.
- Ghosh A. K., Gong G., Grum-Tokars V. *et al.* Design, synthesis and antiviral efficacy of a series of potent chloropyridyl ester-derived SARS-CoV 3CLpro inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008; 18: 5684–5688. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.08.082.
- Ghosh A. K., Xi K., Johnson M. E., Baker S. C., Mesecar A. D. Progress in anti-SARS coronavirus chemistry, biology and chemotherapy. *Annu Rep Med Chem.* 2007; 41: 183–196. doi: 10.1016/S0065-7743(06)41011-3.
- Ghosh A. K., Xi K., Grum-Tokars V. *et al.* Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of peptidomimetic SARS-CoV 3CLpro inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007; 17 (21): 5876–5880. doi: 10.1016/j.bmcl.2007.08.031.
- Ghosh A. K., Xi K., Ratia K. *et al.* Design and synthesis of peptidomimetic severe acute respiratory syndrome chymotrypsin-like protease inhibitors. *J Med Chem.* 2005; 48: 6767–6771. doi: 10.1021/jm050548m.
- Ratia K., Pegan S., Takayama J. A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 16119–16124. doi: 10.1073/pnas.0805240105.
- Hattori S.-I., Higshi-Kuwata N., Raghavaiah J. *et al.* GRL-0920, an indole chloropyridinyl ester, completely blocks SARS-CoV-2 infection. *mBio.* 2020; 11 (4): e01833–20. doi: 10.1128/mBio.01833-20.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2012. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Moscow: FGBU «NTsESMP» Minzdravotsrazvitiya Rossii, 2012. (in Russian)]
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз., 1962; 180. [Ashmarin I. P., Vorob'ev A. A. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh. Leningrad: Medgiz., 1962; 180. (in Russian)]

Поступила / Received 03.04.2024

Принята в печать / Accepted 10.06.2024

Информация об авторах

Логина Светлана Яковлевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0001-6732-8404

Щукина Вероника Николаевна — к. б. н., старший научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5461-3641

Савенко Сергей Владимирович — научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5175-916X

Рубцов Владимир Васильевич — к. в. н., научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0003-4387-0367

Кутаев Дмитрий Анатольевич — к. б. н., заместитель начальника института, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9009-4909

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, академик РАН РФ, начальник института ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6742-3919

Ковтун Виктор Александрович — к. х. н., начальник ФГБУ «27 Научный центр» Минобороны России, Москва, Россия. ORCID ID: 0009-0003-5870-967X

Мосин Никита Игоревич — к. т. н., начальник управления, ФГБУ «27 Научный центр» Минобороны России, Москва, Россия. ORCID ID: 0009-0001-4423-6336

About the authors

Svetlana Ya. Loginova — D. Sc. in Biology, Leading Researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID: 0000-0001-6732-8404. eLibrary Spin: 8764-7946

Veronika N. Schukina — Ph. D. in Biology, Researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID: 0000-0002-5461-3641. eLibrary Spin: 1504-4433

Sergey V. Savenko — Researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID: 0000-0002-5175-916X. eLibrary Spin: 6353-7075

Vladimir V. Rubtsov — Ph. D. in Veterinary Sciences, Researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID ID: 2ФГБУ «27 Научный центр» Минобороны России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-4387-0367

Kutayev Dmitry A. — Ph. D. in Biology, Deputy Head of the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9009-4909

Sergey V. Borisovich — D. Sc. in Biology, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID: 0000-0002-6742-3919. eLibrary Spin: 5753-3400

Viktor A. Kovtun — Ph. D. in Chemistry, Head of the 27th Science Center of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0009-0003-5870-967X

Nikita I. Mosin — Ph. D. in Technical Sciences, Department Chief, 27th Science Center of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0009-0001-4423-6336

Мурадов Михаил Михайлович — к. х. н., начальник отдела, ФГБУ «27 Научный центр» Минобороны России, Москва, Россия. ORCID ID: 0009-0001-6663-4642

Волков Виталий Леонардович — к. х. н., заместитель начальника отдела, начальник отдела, ФГБУ «27 Научный центр» Минобороны России, Москва, Россия. ORCID ID: 0009-0006-7933-4522

Беляев Артур Сергеевич — к. х. н., начальник лаборатории, начальник отдела, ФГБУ «27 Научный центр» Минобороны России, Москва, Россия. ORCID ID: 00009-0003-7269-1533

Предтеченский Александр Борисович — д. б. н., старший научный сотрудник, начальник отдела, ФГБУ «27 Научный центр» Минобороны России, Москва, Россия. ORCID ID: 0009-0002-2236-5572

Mikhail M. Muradov — Ph. D. in Chemistry, Department Head, 27th Science Center of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0009-0001-6663-4642

Vitaly L. Volkov — Ph. D. in Chemistry, Department Deputy Head, Department Head, 27th Science Center of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0009-0006-7933-4522

Artur S. Belyaev — Ph. D. in Chemistry, Head of the Laboratory, 27th Science Center of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 00009-0003-7269-1533

Alexander B. Predtechensky — D. Sc. in Biology, Senior Researcher, Department Head, 27th Science Center of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0009-0002-2236-5572

Чувствительность штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных COVID-19, к коммерчески доступным препаратам бактериофагов

Б. И. АСЛАНОВ¹, *А. Е. ГОНЧАРОВ^{2,1}, С. Д. КОНЕВ^{1,3}, А. С. МОХОВ¹,
Д. В. АЗАРОВ^{2,1}, Е. А. ЛЕБЕДЕВА¹, А. В. КУЛЕШОВА⁴, В. В. КОЛОДЖИЕВА¹,
Е. Н. КОЛОСОВСКАЯ¹, А. М. НИФОНТОВА⁵, Д. А. ЛИОЗНОВ^{5,6}

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁶ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. Суперинфекция, обусловленная *Klebsiella pneumoniae*, занимает лидирующие позиции в структуре бактериальных осложнений у больных COVID-19. Интенсивная циркуляция клебсиелл в условиях специализированных стационаров способствовала закреплению наиболее клинически и эпидемически значимых штаммов данного возбудителя, в частности представителей гипervирулентных и карбапенеморезистентных клональных линий, не теряющих актуальности и в постпандемический период. Применение бактериофагов в качестве лечебных и противозидемических средств представляется обоснованным с учётом широкого распространения мультиантибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae*. **Цель исследования.** Оценка чувствительности штаммов *K. pneumoniae*, ассоциированных с нозокомиальными инфекциями у больных COVID-19, к поливалентным препаратам бактериофагов. **Материал и методы.** В исследование были включены 96 неповторяющихся штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в период с мая 2020 г. по январь 2021 г. из клинического материала больных тяжёлыми и среднетяжёлыми формами COVID-19, поступивших в крупный стационар г. Санкт-Петербурга. Оценку чувствительности клинических штаммов к бактериофагам проводили методом спот-теста. Для тестирования использовали коммерчески доступные препараты бактериофагов: полибактериофаг поливалентный очищенный, секстафаг и полибактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный. Для выявления вероятных механизмов фагорезистентности госпитальных штаммов *K. pneumoniae* были изучены нуклеотидные последовательности генома 6 штаммов данного возбудителя, отнесённых к доминирующим в стационаре генетическим линиям ST3, ST39, ST307, ST395, ST874. **Результаты.** Отрицательные результаты спот-тестов наблюдали в 32,29% (95% ДИ=23,8–42,2) случаев. Доля пациентов, в отношении которых могла быть применена фаготерапия, составила 49% (95% ДИ=39,2–58,8). В структуре геномов изученных штаммов идентифицированы потенциально ассоциированные с резистентностью к бактериофагам CRISPR-Cas локусы 1 класса субтипов IV-A3 и I-E, а также ряд профаговых последовательностей. **Заключение.** В исследовании продемонстрирована невысокая активность поливалентных бактериофаговых препаратов в отношении штаммов *K. pneumoniae*, вызывающих нозокомиальные инфекции у больных COVID-19. Расширение возможностей фаготерапии клебсиеллёзных инфекций может быть реализовано за счёт увеличения разнообразия штаммов бактериофагов, активных в отношении эпидемически актуальных клонов *K. pneumoniae*. Рациональное применение, включающее данные бактериофаги, возможно в рамках персонализированной фаготерапии.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; фаготерапия; COVID-19; чувствительность к бактериофагам; спот-тест

Для цитирования: Асланов Б. И., Гончаров А. Е., Конев С. Д., Мохов А. С., Азаров Д. В., Лебедева Е. А., Кулешова А. В., Колоджиева В. В., Колосовская Е. Н., Нифонтова А. М., Лиознов Д. А. Чувствительность штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных COVID-19, к коммерчески доступным препаратам бактериофагов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2024; 69 (11–12): 59–66. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-59-66>. EDN: LKBMNT.

The Susceptibility of *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from COVID-19 Patients to Commercially Available Bacteriophage Medications

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: phage1@yandex.ru



*Correspondence to:
E-mail: phage1@yandex.ru

EDN: LKBMNT



BATYRBEK I. ASLANOV¹, ARTEMIY E. GONCHAROV^{2,1}, SERGEI D. KONEV^{1,3},
ALEXEY S. MOCHOV¹, DANIIL V. AZAROV^{2,1}, EKATERINA A. LEBEDEVA¹,
ALYONA V. KULESHOVA⁴, VIKTORIA V. KOLODZHIEVA¹, ELENA N. KOLOSOVSKAYA¹,
ANNA M. NIFONTOVA⁵, DMITRY A. LIOZNOV^{5,6}

¹ North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

³ Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

⁴ Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint Petersburg, Russia

⁵ Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

⁶ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Background. Superinfection caused by *Klebsiella pneumoniae* occupies a leading position in the structure of bacterial complications in COVID-19 patients. The intensive circulation of *Klebsiella* in specialised hospitals has contributed to the consolidation of the most clinically and epidemiologically important strains of this pathogen, in particular, representatives of hypervirulent and carbapenem-resistant clonal lines, which have not lost their relevance even in the post-pandemic period. The use of bacteriophages as therapeutic and anti-epidemic agents seems justified given the widespread use of multidrug-resistant strains of *K. pneumoniae*. **Aim of the study.** To evaluate the susceptibility of *K. pneumoniae* strains associated with nosocomial infections in patients with COVID-19 to polyvalent bacteriophage medications. **Materials and methods.** The study included 96 non-repeating *K. pneumoniae* strains isolated from clinical material of patients admitted to a major hospital in St. Petersburg with severe and moderate forms of COVID-19 from May 2020 to January 2021. The susceptibility of clinical strains to bacteriophages was assessed using the spot test analysis. Commercially available bacteriophage preparations used for testing included the following: purified polyvalent pyobacteriophage, sextaphage, and purified polyvalent *Klebsiella* pyo-bacteriophage. In order to identify the probable mechanisms of resistance of hospital strains of *K. pneumoniae*, the nucleotide sequences of the genomes of 6 strains of this pathogen belonging to the dominant hospital genetic lines ST3, ST39, ST307, ST395, ST874 were studied. **Results.** Negative results of spot tests were observed in 32.29% (95% CI=23.8–42.2) of cases; in general, the proportion of patients eligible for treatment with phage therapy was 49% (95% CI=39.2–58.8). Loci of class 1 subtypes IV-A3 and I-E, potentially associated with resistance to CRISPR-Cas, were identified in the genome structure of the studied strains, as well as a number of prophage sequences potentially associated with resistance to bacteriophages. **Conclusion.** The study demonstrated low activity of polyvalent bacteriophage medications against *K. pneumoniae* strains causing nosocomial infections in patients with COVID-19. Increasing the diversity of bacteriophage strains active against epidemiologically relevant *K. pneumoniae* clones can expand the possibilities of phage therapy for *Klebsiella* infections. The rational use of medications containing these bacteriophages is possible within the paradigm of personalised phage therapy.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; phage therapy; COVID-19; sensitivity to bacteriophages; spot test

For citation: Aslanov B. I., Goncharov A. E., Konev S. D., Mochov A. S., Azarov D. V., Lebedeva E. A., Kuleshova A. V., Kolodzhieva V. V., Kolosovskaya E. N., Nifontova A. M., Lioznov D. A. The susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from COVID-19 patients to commercially available bacteriophage medications. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 59–66. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-59-66>. EDN: LKBMNT. (in Russian)

Введение

Бактериальная суперинфекция является одним из наиболее значимых с клинических и эпидемиологических позиций осложнением COVID-19, обуславливая до 50% внутрибольничной летальности в специализированных стационарах [1]. Из числа возбудителей бактериальных инфекций, осложняющих течение COVID-19, лидирующие позиции занимает *Klebsiella pneumoniae* [2].

Широкое распространение в медицинских организациях, в том числе оказывающих помощь больным COVID-19, приобрели карбапенеморезистентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* (CRKP). Так, например, частота колонизации ими пациентов в российских специализированных стационарах на пике пандемии достигала 24% [3]. Кроме того, показано, что в стационарах, предназначенных для лечения COVID-19, эпидемический процесс инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), характеризуется высокой частотой экзогенного (перекрёстного) инфицирования пациентов мультирезистентными штам-

мами клебсиелл, что определяет невысокую степень генетического разнообразия госпитальных популяций данного возбудителя [4].

Вследствие длительной циркуляции *K. pneumoniae* в госпитальных условиях произошло закрепление наиболее клинически и эпидемически значимых клональных линий CRKP, к числу которых относятся гипервирулентные штаммы сиквенс-типов ST395, ST23, ST147 [5]. Данные генетические линии сохраняют свою эпидемическую актуальность и в постпандемический период, циркулируя как в западно-европейских, так и в российских стационарах [6, 7].

В условиях распространения в стационарах ограниченного числа эпидемических клонов, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью представляется привлекательным применение бактериофагов как в качестве лечебных, так и противозидемических средств [8]. Однако, эффективность применения бактериофагов для контроля распространения возбудителей ИСМП зависит от ряда условий и в первую оче-

Таблица 1. Характеристика секвенированных штаммов *K. pneumoniae*Table 1. Characteristics of sequenced *K. pneumoniae* strains

№ штамма	ST	Гены карбапенемаз	Номер доступа GenBank
5232	23	—	GCA_019391975.1
5216	39	—	GCA_019391995.1
4954	307	—	GCA_019392015.1
4893	395	BlaNDM-1, blaOXA-48	GCA_019392075.1
4774	874	—	GCA_019392135.1
5085	395	BlaNDM-1, blaOXA-48	GCA_019392005.1

редь определяется чувствительностью бактерий к вирусам, входящим в состав препарата. В то же время имеется лишь ограниченное число наблюдений, направленных на изучение чувствительности к терапевтическим бактериофаговым препаратам штаммов *K. pneumoniae*, получившим распространение в период пандемии COVID-19.

Цель исследования — оценка чувствительности штаммов *K. pneumoniae*, ассоциированных с нозокомиальными инфекциями у больных с COVID-19, к поливалентным препаратам бактериофагов.

Материал и методы

В исследование были включены штаммы *K. pneumoniae*, выделенные в период с мая 2020 г. по январь 2021 г. из клинического материала (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, трахеальные аспираты) взрослых больных тяжёлыми и среднетяжёлыми формами COVID-19, поступивших в крупный стационар г. Санкт-Петербурга (коды МКБ U07.1, U07.2). Для оценки чувствительности к препаратам бактериофагов были отобраны неповторяющиеся изоляты, выделенные не ранее чем через 48 ч пребывания пациентов в стационаре.

В общей сложности в исследование было включено 96 штаммов клебсиелл, в том числе 44 карбапенеморезистентных клебсиелл (CRE) и 27 штаммов — продуцентов бета-лактамаз с расширенным спектром (БЛРС). Отнесение штаммов к данному фенотипу резистентности проводили на основании критериев EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing — Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам) (<<https://www.antibiotic.ru/eucast/>>). При этом карбапенеморезистентному фенотипу соответствовали штаммы с минимальной подавляющей концентрацией меропенема или имипенема >8,0 мкг/мл, верификация продукции БЛРС осуществлялась методом двойных дисков с цефтазидимом (30 мкг) и амоксицилином (20 мкг) с клавулановой кислотой (10 мкг) (ЗАО НИЦФ, Санкт-Петербург).

Оценка чувствительности клинических штаммов к бактериофагам проводили методом спот-тест. Для тестирования использовали следующие препараты бактериофагов: пиобактериофаг поливалентный очищенный (АО «НПО «Микроген», Россия, серия У02, г. Уфа), секстафаг (АО «НПО «Микроген», Россия, серия П158, г. Пермь) и пиобактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (АО «НПО «Микроген», Россия, серия У04, г. Уфа). Все тестируемые препараты использовались в пределах сроков годности, указанных производителем.

Литическая активность бактериофагов оценивалась путём визуальной оценки зоны лизиса на месте капель фага по пятибальной шкале: отсутствие литической активности (–), низкая литическая активность (+), лизис с большим количеством колоний вторичного роста (++) , лизис с единичными колониями вторичного роста (+++), сплошной лизис на месте капли без колоний вторичного роста (++++), в соответствии с методическими рекомендациями [9]. Литическую активность

бактериофага считали достаточной для терапевтического применения при получении результата оценки спот-теста «+++» и «++++».

Статистическая обработка результатов определения чувствительности к бактериофагам проводилась с использованием программы EPITOOLS (<<https://epitools.ausvet.com.au/prevalence>>) и включала в себя расчёт 95% доверительных интервалов для частотных показателей.

Для выявления вероятных механизмов фагорезистентности госпитальных штаммов *K. pneumoniae* были изучены нуклеотидные последовательности генома 6 штаммов данного возбудителя, отнесённых к доминирующим в стационаре генетическим линиям (табл. 1) по результатам предыдущих исследований, включавшим в себя сочетание RAPD генотипирования и полногеномного секвенирования [10, 11].

Данный фрагмент исследования включал в себя определения типа локусов синтеза капсулы (К-локусов) на основании полноразмерных нуклеотидных последовательностей генов, детерминирующих их синтез, а также поиск CRISPR-локусов. Обнаружение массивов CRISPR-Cas и прогнозирование подтипа на основе Cas генов осуществлялось с помощью CRISPRCasTyper [12]. Кроме того, в изучаемых геномах осуществляли поиск профаговых последовательностей при помощи PhaMer [13] и PhaTYP [14].

Результаты и обсуждение

Результаты тестирования препаратов бактериофагов в отношении клинических изолятов демонстрируют высокую долю нечувствительных штаммов *K. pneumoniae*. Отрицательный результат спот-тестов наблюдали в 32,3% (95% ДИ=23,8–42,2) случаев, причём спектр литической активности для отдельных фаговых коктейлей варьировал от 15,6% для препарата Секстафаг до 34,4% для Пиобактериофага клебсиелл поливалентного очищенного (табл. 2). С учётом того, что согласно имеющимся методическим рекомендациям для успешной терапии могут быть применены фаги с литической активностью по отношению к тестируемым культурам, соответствующей «+++» и «++++», доля пациентов, которым могла быть применена фаготерапия, составила 49% (95% ДИ=39,2–58,8).

Штаммы клебсиелл без выявленной продукции бета-лактамаз расширенного спектра и карбапенемаз проявляли более высокую чувствительность к препаратам бактериофагов, чем штаммы, располагающие этими механизмами антибиотикорезистентности. Данный факт может быть объяснён с позиций концепции формирования в стационарах «тройственных паразитарных систем», включающих в себя пациентов и по-

Таблица 2. Фагочувствительность штаммов *K. pneumoniae*, %

Table 2. Phage sensitivity of *K. pneumoniae* strains, %

Штаммы <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Результаты спот-теста, %						Всего штаммов с оценкой «+++» и «++++»
	«-»	«+»	«++»	Всего штаммов с оценкой «-», «+» и «++»	«+++»	«++++»	
Секстафаг (П158, г. Пермь)							
Все фенотипы (n=96)	63,5	14,6	6,3	84,4	7,3	8,3	15,6
БЛРС (n=27)	63,0	18,5	7,4	88,9	3,7	7,4	11,1
CRE (n=44)	68,2	18,2	4,5	90,9	6,8	2,3	9,1
Штаммы без выявленной продукции БЛРС, с сохранённой чувствительностью к карбапенемам (n=25)	56,0	4,0	8,0	68,0	12,0	20,0	32,0
Пиобактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (У04, г. Уфа)							
Все фенотипы (n=96)	35,4	12,5	13,5	61,5	15,6	22,9	38,5
БЛРС (n=27)	40,7	11,1	14,8	66,7	11,1	22,2	33,3
CRE (n=44)	31,8	15,9	13,6	61,4	25,0	13,6	38,6
Штаммы без выявленной продукции БЛРС, с сохранённой чувствительностью к карбапенемам (n=25)	36,0	8,0	12,0	56,0	4,0	40,0	44,0
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (У02, г. Уфа)							
Все фенотипы (n=96)	41,7	12,5	11,5	65,6	24,0	10,4	34,4
БЛРС (n=27)	48,1	11,1	7,4	66,7	25,9	7,4	33,3
CRE (n=44)	38,6	11,4	20,5	70,5	20,5	9,1	29,5
Штаммы без выявленной продукции БЛРС, с сохранённой чувствительностью к карбапенемам (n=25)	40,0	16,0	0,0	56,0	28,0	16,0	44,0

пуляции циркулирующих бактериофагов и бактерий [15]. В рамках данной концепции выдвинуто предположение, что стихийно циркулирующие в стационарах бактериофаги (умеренные и литические с низкой вирулентностью) являются важнейшими драйверами эволюции госпитальных штаммов возбудителей ИСМП, обеспечивая распространение детерминант устойчивости к антибиотикам и формируя резистентность к инфекции литическими фагами.

Различия в чувствительности тестируемых штаммов к изучаемым препаратам могут быть объяснены разницей видового или штаммового состава бактериофаговых коктейлей. Качественный состав вирусов, входящих в рецептуру терапевтических препаратов, не отражается в инструкции и может варьировать в различных препаратах и от серии к серии [16].

При оценке перекрёстной чувствительности штаммов клебсиелл к трём препаратам бактериофагов, оказалось, что спектры литической активности препаратов пересекаются не полностью (рисунок). К пиобактериофагу клебсиелл оказались чувствительны 7 штаммов, устойчивых к действию других препаратов; 6 штаммов — чувствительны только к пиобактериофагу поливалентному; 1 штамм чувствительный только к секстафагу.

Таким образом, представляется обоснованным тестирование чувствительности, выделенных штаммов *K. pneumoniae*, к нескольким фаговым препаратам, что позволяет расширить возможности фаготерапии клебсиеллёзной инфекции. Для персонализированной фаготерапии нозокомиальных инфекций целесообразно иметь



Перекрёстная чувствительность штаммов *K. pneumoniae* к тестируемым препаратам
Cross-sensitivity of *K. pneumoniae* strains to the tested medicines

Таблица 3. Чувствительность к препаратам бактериофагов и особенности генотипа штаммов *K. pneumoniae* на основании анализа геномных последовательностей**Table 3. Sensitivity of *K. pneumoniae* strains to bacteriophage preparations and genotype characteristics based on genomic sequence analysis**

№ штамма	Чувствительность к препаратам бактериофагов			Полиморфизм генов капсулы и её тип		Класс тип, субтип локуса CRISPR	Характеристика профаговых последовательностей	
	поливалентный очищенный УО02 г. Уфа	секста-фаг П158 г. Пермь	поливалентный очищенный У04 г. Уфа	wzi type	K тип		количество профаговых локусов	номера доступа в GenBank последовательностей, наиболее сходных с выявленными профаговыми локусами
5232	—	—	—	wzi1	KL1	1, I-E	1	MK416021
4774	+	+	+	wzi222	KL45	1, IV-A3	6	MK448236, OR532908, MK416021, NC_001609, AF234172
5085	++++	—	++++	wzi64	KL64	1, IV-A3	6	OR532908, OP114732, MK416019, MK416020, MK422455, MK422454
4954	+	—	+	wzi173	KL102	1, IV-A3	2	KY271399
4893	+	+	+	wzi64	KL64	1, IV-A3	5	NC_047817, MK416019, MK416020, MK422455, MK422454
5216	—	—	—	wzi62	KL62	1, I-E	2	MK416021, AF234172

в арсенале несколько препаратов, что позволит осуществить подбор фагов, активных в отношении конкретного штамма возбудителя.

Существенная часть изученных изолятов (51,0%) обладает устойчивостью или низкой восприимчивостью к тестируемым препаратам, что соответствует невозможности их применения для лечения клебсиеллёзной инфекции. Невысокая активность поливалентных бактериофаговых препаратов в отношении клинических штаммов клебсиелл отмечалась и ранее в ряде исследований [17, 18].

Фенотипическая устойчивость изученных в нашей работе штаммов к бактериофаговым коктейлям может объясняться широким распространением штаммов, располагающих эффективными механизмами противодействия фаговой инфекции, что подтверждается обнаружением в структуре их геномов полиморфных CRISPR-Cas локусов (табл. 3). Обращает внимание тот факт, что абсолютной устойчивостью ко всем бактериофаговым препаратам обладали штаммы с типом CRISPR I-E, в то время как штаммы с типом CRISPR IV-A3 сохраняли чувствительность к бактериофагам. CRISPR I класса, в целом, являются наиболее древними системами противофаговой защиты у бактерий [19], при этом тип I-E наиболее широко распространён среди Enterobacteriaceae [20].

Следует отметить, что основной функцией CRISPR — элементов типа IV-A3, имеющих у клебсиелл плазмидную локализацию, является, главным образом, участие в регуляции процессов при-

обретения конъюгативных плазмид, что может объяснять меньшую эффективность CRISPR данного типа в обеспечении антифаговой защиты бактериальных клеток [21]. Очевидно, дальнейшие исследования позволят прояснить роль CRISPR элементов различных субтипов в качестве факторов, обеспечивающих невосприимчивость клинических штаммов *K. pneumoniae* к бактериофагам, входящим в состав терапевтических препаратов.

С другой стороны мы можем отметить, что чувствительность к различным бактериофаговым препаратам обнаруживалась у штаммов, различающихся по типу генов капсулы, в том числе фаги могли быть применены для лечения инфекции, обусловленной штаммом 5085, отнесённого к wzi-типу 64, KL64. Инфекции, связанные с гипервирулентными штаммами данного капсульного типа демонстрировали значительный рост в Китае на фоне пандемии COVID-19 [22, 23] и получили широкое распространение в других странах [24, 25].

Известно, что клебсиеллёзные бактериофаги проявляют специфичность в отношении штаммов *K. pneumoniae* с определённым типом капсулы, в связи с чем предложена идеология разработки бактериофаговых коктейлей, учитывающая вариативность структуры популяции возбудителя по данному признаку [26].

Таким образом, одним из путей совершенствования рецептуры бактериофаговых препаратов является подбор бактериофагов, активных в отношении эпидемически актуальных клонов, ха-

рактизирующихся определённым капсульным (К) типом.

В то же время прогнозирование литической активности бактериофаговых препаратов в отношении клинических штаммов клебсиелл в настоящее время представляется затруднительным. В нашей работе мы наблюдали различия в чувствительности к бактериофаговым препаратам у двух штаммов (4893 и 5085), представляющих собой, судя по данным их генетического типирования, один клон (ST395-KL64) и выделенных в одном стационаре. Генетические различия между этими штаммами связаны лишь с изменениями в участках, относящихся к профагам. В этой связи, следует обратить внимание на потенциальное значение умеренных бактериофагов в качестве факторов, оказывающих влияние на эффективность фаготерапии.

Заключение

В настоящем исследовании продемонстрирована невысокая активность поливалентных бактериофаговых препаратов в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae*, вызывающих нозокомиальные инфекции у пациентов с COVID-19.

Расширение возможностей фаготерапии клебсиеллёзных инфекций может быть реализовано за счёт использования широкой линейки бактериофаговых препаратов, включающих в себя штаммы бактериофагов, активные в отношении эпидемически актуальных клонов. С учётом достаточно узкого спектра литического дей-

ствия клебсиеллёзных бактериофагов [27], рациональное применение включающих их препаратов возможно в рамках парадигмы персонализированной фаготерапии.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 24-15-20022, <https://rscf.ru/project/24-15-20022/> и за счёт гранта Санкт-Петербургского научного фонда № 24-15-20022.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. *Асланов Батырбек Исмаилович* — разработка дизайна исследования, редактирование рукописи, *Гончаров Артемий Евгеньевич* — анализ данных, написание текста статьи, *Конов Сергей Дмитриевич* — проведение экспериментов, *Мохов Алексей Сергеевич* — выделение культур микроорганизмов, биоинформационная обработка геномных данных, *Азаров Даниил Валерьевич* — биоинформационная обработка геномных данных, редактирование текста рукописи, *Лебедева Екатерина Андреевна* — проведение экспериментов, *Кулешова Алёна Витальевна* — идентификация микроорганизмов, *Колоджиева Виктория Васильевна* — выделение культур микроорганизмов, *Колосовская Елена Николаевна* — редактирование текста рукописи, *Нифонтова Анна Михайловна* — проведение экспериментов, *Лиознов Дмитрий Анатольевич* — руководство научным исследованием, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

1. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Chen H, Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395 (10229): 1054–1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
2. Sang L, Xi Y, Lin Z, Pan Y, Song B, Li C. A. Zheng X, Zhong M, Jiang L, Pan C, Zhang W, Lv Z, Xia J, Chen N, Wu W, Xu Y, Chen S, Liu D, Liang W, Liu X, Liu X, Li S, Zhong N, Ye D, Xu Y, Zhang N, Zhang D, Li Y. Secondary infection in severe and critical COVID-19 patients in China: a multicenter retrospective study. *Annals of Palliative Medicine*. 2021; 10 (8): 8557–8570. doi: 10.21037/apm-21-833.
3. Гончаров А. Е., Зуева Л. П., Мохов А. С. и др. Распространение мультиантибиотикорезистентных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в стационарах для лечения пациентов с COVID-19. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021; 20 (2): 68–73. doi: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-68-73>. [Goncharov A.E., Zueva L.P., Mokhov A.S., Kolodzhieva V.V., Meltser A.A., Smirnova M.V., Khavlina T.V., Orishak E.A. Spread of multi-antibiotic-resistant health-care pathogens in hospitals to treat COVID-19 patients. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021; 20 (2): 68–73. doi: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-68-73>. (in Russian)]
4. Mashigo B, Parker A, Lalla U, Allwood B. W. Moolla M. S. Lovelock T, Koegelenberg CFN. An outbreak within an outbreak: the impact of infection prevention and control strategies on hospital-acquired infections and the occurrence of multi-drug resistant organisms during the COVID-19 pandemic. *S Afr Med J*. 2023 Dec 4; 113 (12): 42. doi: 10.7196/SAMJ.2023.v113i12.97.
5. Loconsole D, Sallustio A, Sacco D, Santantonio M, Casulli D, Gatti D, Accogli M, Parisi A, Zagaria R, Colella V, Centrone F, Chironna M. Genomic surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* reveals a prolonged outbreak of extensively drug-resistant ST147 NDM-1 during the COVID-19 pandemic in the Apulia region (Southern Italy). *J Glob Antimicrob Resist*. 2024 Mar; 36: 260–266. doi: 10.1016/j.jgar.2024.01.015.
6. Sandfort M, Hans J. B. Fischer M. A. Reichert F., Cremanns M., Eisfeld J., Pfeifer Y., Heck A., Eckmanns T., Werner G., Gatermann S., Haller S., Pfennigwerth N. Increase in NDM-1 and NDM-1/OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Germany associated with the war in Ukraine, 2022. *Euro Surveill*. 2022 Dec; 27 (50): 2200926. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.50.2200926.
7. Самойлова А. А., Краева Л. А., Михайлов Н. В., Саитова А. Т., Полев Д. Е., Васькова М. А., Гордеева С. А., Смирнова Е. В., Белятич Л. И., Долгова А. С., Шабалина А. В. Геномный анализ вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*. *Инфекция и иммунитет*. 2024; 14 (2): 339–350. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GAO-15645>. [Samoilova A.A., Kraeva L.A., Mikhailov N.V., Saitova A.T., Polev D.E., Vashukova M.A., Gordeeva S.A., Smirnova E.V., Beljatic L.I., Dolgova A.S., Shabalina A.V. Genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains virulence and antibiotic resistance. *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i Immunitet*. 2024; 14 (2): 339–350 doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GAO-15645> (in Russian)]
8. Mohammadi M., Saffari M., Siadat S. D. Hejazi S. H. Shayestehpour M., Motalebi M., Eidi M. Isolation, characterization, therapeutic potency, and genomic analysis of a novel bacteriophage vB_KshKPC-M against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains (CRKP) isolated from Ventilator-associated pneumoniae (VAP) infection of COVID-19 patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2023 Feb 24; 22 (1): 18. doi: 10.1186/s12941-023-00567-1.
9. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. Методические рекомендации. М.: 2022; 32. [Rational'noe primenenie bakteriofagov v lechebnoj i protivoepr-

- demicheskoy praktike. Metodicheskie rekomendacii. Moscow: 2022; 32. (in Russian)]
10. Гончаров А. Е., Зуева Л. П., Мохов А. С., Колоджиева В. В., Мельцер А. А., Смирнова М. В., Хавлина Т. В., Оришак Е. А. Распространение мультиантибиотикорезистентных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в стационарах для лечения пациентов с COVID-19. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021; 20 (2): 68–73. doi: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-68-73>. [Goncharov A. E., Zueva L. P., Mokhov A. S., Kolodzhieva V. V., Meltser A. A., Smirnova M. V., Khavlina T. V., Orishak E. A. Spread of Multi-Antibiotic-Resistant health-care pathogens in hospitals to treat COVID-19 patients. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021; 20 (2): 68–73. doi: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-68-73>. (in Russian)]
 11. Гончаров А. Е., Азаров Д. В., Мохов А. С., Почтовый А. А., Кустова Д. Д., Гуцин В. А., Лебедева Е. А., Колоджиева В. В., Киреева А. Г., Краева Л. А., Долинный С. В., Бурасова О. А., Гончарова А. Р., Белькова Е. И., Дмитриев А. В. Характеристика гипервирулентных мультиантибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* у стационарных пациентов с тяжёлым течением COVID-19. Инфекционные болезни. 2022; 20 (2): 33–40. doi: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-2-33-40>. [Goncharov A. E., Azarov D. V., Mokhov A. S., Pochtoviy A. A., Kustova D. D., Gushchin V. A., Lebedeva E. A., Kolodzhieva V. V., Kireeva A. G., Kraeva L. A., Dolinny S. V., Burgasova O. A., Goncharova A. R., Belkova E. I., Dmitriev A. V. Characteristics of hypervirulent multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in inpatients with severe COVID-19. *Infektsionnye Bolezni (Infectious Diseases)*. 2022; 20 (2): 33–40. doi: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-2-33-40>. (in Russian)]
 12. Russel J., Pinilla-Redondo R., Mayo-Muñoz D., Shah S. A., Sørensen S. J. CRISPR-Cas Typing: automated identification, annotation, and classification of CRISPR-Cas Loci. *CRISPR J*. 2020 Dec; 3 (6): 462–469. doi: 10.1089/crispr.2020.0059.
 13. Shang J., Tang X., Guo R., Sun Y. Accurate identification of bacteriophages from metagenomic data using Transformer. *Brief Bioinform*. 2022 Jul 18; 23 (4): bbac258. doi: 10.1093/bib/bbac258.
 14. Shang J., Tang X., Sun Y. PhATYP: predicting the lifestyle for bacteriophages using BERT. *Brief Bioinform*. 2023 Jan 19; 24 (1): bbac487. doi: 10.1093/bib/bbac487.
 15. Зуева Л. П., Асланов Б. И., Акимкин В. Г. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014; 3: 100–107. [Zueva L. P., Aslanov B. I., Akimkin V. G. Contemporary view on the role of bacteriophages in evolution of nosocomial strains and prophylaxis of healthcare associated infections. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2014 May-Jun; (3): 100–107. (in Russian)]
 16. Villarroel J., Larsen M. V., Kilstrup M., Nielsen M. Metagenomic Analysis of Therapeutic PYO Phage Cocktails from 1997 to 2014. *Viruses*. 2017 Nov 3; 9 (11): 328. doi: 10.3390/v9110328.
 17. Баязитова Л. Т., Тупкина О. Ф., Чазова Т. А., Родионова М. С., Анамов Р. И., Попцов О. И., Валуцкина И. Р., Насыбуллова З. З. Оценка литической активности бактериофагов в отношении *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от детей с пневмококковым носительством. Практическая медицина. 2023; 21 (5): 80–85. [Bayazitova L. T., Tyupkina O. F., Chazova T. A., Rodionova M. S., Anamov R. I., Popcov O. I., Valiullina I. R., Nasybullova Z. Z. Ocenka liticheskoj aktivnosti bakteriofagov v otnoshenii *Klebsiella pneumoniae*, vydelennyh ot detej s pnevmokokkovym nositel'stvom. *Prakticheskaya Medicina*. 2023; 21 (5): 80–85. (in Russian)]
 18. Козлова А. И., Топальский Д. В. Чувствительность к антибиотикам и бактериофагам клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с классическим и гипермукоидным фенотипами. Военная медицина. 2019; 1 (50): 44–48. [Kozlova A. I., Topal'skij D. V. Chuvstvitel'nost' k antibiotikam i bakteriofagam klinicheskijh izolyatov *Klebsiella pneumoniae* s klassicheskim i giper mukoidnym fenotipami. *Voennaya Medicina*. 2019; 1 (50): 44–48. (in Russian)]
 19. Makarova K. S., Zhang F., Koonin E. V. Snapshot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell*. 2017 Feb 23; 168 (5): 946–946.e1. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.018.
 20. Xue C., Sashital D. G. Mechanisms of type I-E and I-F CRISPR-Cas systems in Enterobacteriaceae. *EcoSal Plus*. 2019 Feb; 8 (2): 10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2018. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2018.
 21. Benz F., Camara-Wilpert S., Russel J., Wandera K. G., Čepaitė R., Ares-Arroyo M., Gomes-Filho J. V., Englert F., Kuehn J. A., Gloor S., Mestre M. R., Cuénod A., Aguilà-Sans M., Maccario L., Egli A., Randau L., Pausch P., Rocha EPC, Beisel C. L., Madsen J. S., Bikard D., Hall A. R., Sørensen S. J., Pinilla-Redondo R. Type IV-A3 CRISPR-Cas systems drive inter-plasmid conflicts by acquiring spacers in trans. *Cell Host Microbe*. 2024 Jun 12; 32 (6): 875–886.e9. doi: 10.1016/j.chom.2024.04.016.
 22. Wang J., Feng Y., Zong Z. The Origins of ST11 KL64 *Klebsiella pneumoniae*: a Genome-Based Study. *Microbiol Spectr*. 2023 Mar 27; 11 (2): e0416522. doi: 10.1128/spectrum.04165-22.
 23. Hu F., Pan Y., Li H., Han R., Liu X., Ma R., Wu Y., Lun H., Qin X., Li J., Wang A., Zhou M., Liu B., Zhou Z., He P. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* capsular types, antibiotic resistance and virulence factors in China: a longitudinal, multi-centre study. *Nat Microbiol*. 2024 Mar; 9 (3): 814–829. doi: 10.1038/s41564-024-01612-1.
 24. Eckstein S., Stender J., Mzoughi S., Voegelé K., Kühn J., Friese D., Bugert C., Handrick S., Ferjani M., Wölfel R., Millard A., Ben Moussa M., Bugert J. J. Isolation and characterization of lytic phage TUN1 specific for *Klebsiella pneumoniae* K64 clinical isolates from Tunisia. *BMC Microbiol*. 2021 Jun 21; 21 (1): 186. doi: 10.1186/s12866-021-02251-w.
 25. Hallal Ferreira Raro O., Nordmann P., Dominguez Pino M., Findlay J., Poirel L. Emergence of carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2023 Mar 16; 67 (3): e0142422. doi: 10.1128/aac.01424-22.
 26. Chen H., Liu H., Gong Y., Dunstan R. A. Ma Z., Zhou C., Zhao D., Tang M., Lithgow T., Zhou T. A *Klebsiella*-phage cocktail to broaden the host range and delay bacteriophage resistance both *in vitro* and *in vivo*. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2024 Nov 14; 10 (1): 127. doi: 10.1038/s41522-024-00603-8.
 27. Chen H., Liu H., Gong Y., Dunstan R. A. Ma Z., Zhou C., Zhao D., Tang M., Lithgow T., Zhou T. A *Klebsiella*-phage cocktail to broaden the host range and delay bacteriophage resistance both *in vitro* and *in vivo*. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2024 Nov 14; 10 (1): 127. doi: 10.1038/s41522-024-00603-8.

Поступила / Received 01.12.2024

Принята в печать / Accepted 10.12.2024

Информация об авторах

Асланов Батырбек Исмаилович — д. м. н., заведующий кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии; заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6890-8096

Гончаров Артемий Евгеньевич — д. м. н., заведующий лабораторией функциональной геномики и протеомики микроорганизмов ФГБНУ Институт экспериментальной медицины; профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5206-6656

About the authors

Batyrbek I. Aslanov — D. Sc. in Medicine, Head of the Department of Epidemiology, Parasitology, and Disinfection; Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Bacteriophage Research, North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6890-8096

Artemiy E. Goncharov — D. Sc. in Medicine, Head of the Laboratory of Functional Genomics and Proteomics of Microorganisms, Institute of Experimental Medicine; Professor of the Department of Epidemiology, Parasitology, and Disinfection; Leading Researcher of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Bacteriophage Research, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5206-6656

Конев Сергей Дмитриевич — аспирант кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, начальник отдела эпидемиологии СПбГУ, КВМТ им. Н. И. Пирогова, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-1919-4725

Мохов Алексей Сергеевич — к. м. н., ассистент кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1519-5299

Азаров Даниил Валерьевич — к. м. н., заведующий лабораторией инновационных методов микробиологического мониторинга НОЦ НИЦМУ Центр персонализированной медицины ФГБНУ Институт экспериментальной медицины; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2483-5144

Лебедева Екатерина Андреевна — к. м. н., ассистент кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9547-0192

Кулешова Алена Витальевна — заведующий бактериологической лаборатории, научный сотрудник ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0009-0008-4744-8079

Колоджиева Виктория Васильевна — к. м. н., доцент кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1537-211X

Колосовская Елена Николаевна — профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID 0000- 0001-6667-2377

Нифонтова Анна Михайловна — аспирант ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0009-0003-4643-0030

Леонов Дмитрий Анатольевич — д. м. н., профессор, директор ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия; заведующий кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3643-7354

Sergei D. Konev — postgraduate student of the Department of Epidemiology, Parasitology, and Disinfection, North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov, Head of the Department of Epidemiology at Pirogov Clinic of High Medical Technologies, Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-1919-4725

Alexey S. Mochov — Ph. D. in Medicine, Assistant at the Department of Epidemiology, Parasitology, and Disinfection, North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1519-5299

Daniil V. Azarov — Ph. D. in Medicine, Head of the Laboratory of Innovative Methods of Microbiological Monitoring, Scientific and Educational Center of the National Center of Medical Sciences, Center for Personalized Medicine, Institute of Experimental Medicine; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Bacteriophage Research, North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-2483-5144

Ekaterina A. Lebedeva — Ph. D. in Medicine, Assistant at the Department of Epidemiology, Parasitology, and Disinfection; Senior Researcher at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Bacteriophage Research, North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9547-0192

Alyona V. Kuleshova — Head of the Bacteriological Laboratory, Researcher, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0009-0008-4744-8079

Viktoria V. Kolodzhieva — Ph. D. in Medicine, Associate Professor at the Department of Epidemiology, Parasitology, and Disinfection, North-West State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1537-211X

Elena N. Kolosovskaya — Professor of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfection, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID 0000- 0001-6667-2377

Anna M. Nifontova — postgraduate student, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0009-0003-4643-0030

Dmitry A. Lioznov — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of Smorodintsev Research Institute of Influenza; Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3643-7354

Эпидемиологические особенности мониторинга чувствительности штаммов *Staphylococcus aureus*

*Н. Х. ОТАМУРАТОВА^{1,2}, Г. К. АБДУХАЛИЛОВА^{1,2},
Д. Р. АХМЕДОВА¹, Ю. А. ТУРСУНОВА³

¹ Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний, Ташкент, Узбекистан

² Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Узбекистан

³ Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр педиатрии, Ташкент, Узбекистан

Резюме

Растущий уровень тревоги относительно возникновения резистентности клинически значимых патогенов привёл к созданию ряда программ надзора для мониторинга фактического уровня резистентности на местном, региональном и государственном уровнях. Цель исследования. Анализ антибиотикочувствительности *Staphylococcus aureus* при инфекциях различной локализации в детской практике. Материал и методы. Исследование проводилось на биологическом материале от пациентов из отделений (кровь, моча, мокрота, зев и др.), который поступал в бактериологическую лабораторию Республиканского научно-практического медицинского центра педиатрии (Р4), за период с января 2020 г. по декабрь 2022 г. Использовали питательные среды и диски с антимикробными препаратами производства Himedia (Индия). Результаты. Анализ чувствительности штаммов *Staphylococcus aureus* показал, что в пилотном учреждении РСПМЦ Педиатрии локальная антибиотикограмма штамма *Staphylococcus aureus* имеет следующую картину: в 98,3% штамм резистентен к пенициллину, в 62,5% — резистентен к эритромицину, в 52,6% — резистентен к клиндамицину, в 48,7% — резистентен к цефокситину, что указывает на резистентность ко всем бета-лактамным антимикробным препаратам, в 16,2% — резистентен к ципрофлоксацину, в 15,4% — резистентен к левофлоксацину, в 7,7% — резистентен к линезолиду и в 5,3% — резистентен к амикацину. Заключение. В общей структуре микроорганизмов стационара преобладали штаммы *Staphylococcus aureus* (50%). Штаммы *Staphylococcus aureus*, выделенные от больных с различными заболеваниями из различных биологических материалов, показали высокий уровень чувствительности к амикацину 94,7%, и рифампицину 94,3%, тогда как высокая резистентность отмечалась к пенициллину 98,3% и цефокситину 48,7% соответственно.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*; микробиологический мониторинг; антимикробные препараты; чувствительность; антибиотикорезистентность; мокрота; кровь; моча

Для цитирования: Отамуратова Н. Х., Абдухалилова Г. К., Ахмедова Д. Р., Турсунова Ю. А. Эпидемиологические особенности мониторинга чувствительности штаммов *Staphylococcus aureus*. Антибиотики и химиотер. 2024; 69 (11–12): 67–74. doi: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-67-74. EDN: IENPXS.

Epidemiological Aspects of Monitoring the Sensitivity of *Staphylococcus aureus* Strains

*NARGIZA KH. OTAMURATOVA^{1,2}, GULNORA K. ABDUKHALILOVA^{1,2},
DILSHODA R. AKHMEDOVA¹, YU. A. TURSUNOVA³

¹ Republican Specialized Scientific-Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology and Infectious Diseases, Tashkent, Uzbekistan

² Tashkent Medical Academy, Tashkent, Uzbekistan

³ Republican Specialized Scientific Practice Medical Center of Pediatrics, Tashkent, Uzbekistan

Abstract

Growing concern about the emergence of resistance in clinically significant pathogens has led to the establishment of a number of surveillance programs to monitor the actual level of resistance at local, regional, and national levels. The aim of the study is to analyze the antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* in infections of various localizations in pediatric practice. Material and methods. The study was conducted using biological material from patients (blood, urine, sputum, pharynx, etc.) received by the bacteriological laboratory of the Republican Scientific and Practical Medical Center of Pediatrics (P4) from different departments, for the period from January 2020 to December 2022. Nutrient media and discs with antimicrobial drugs manufactured by Himedia (India) were used. Results. The analysis of the sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains showed that in the pilot institution of the Republican Specialized Scientific Practice Medical Center, the local

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: nargiza.otamuratova@gmail.com



EDN: IENPXS

*Correspondence to:
E-mail: nargiza.otamuratova@gmail.com



antibiotic profile of the *Staphylococcus aureus* strains has the following picture: 98.3% are resistant to penicillin, 62.5% are resistant to erythromycin, 52.6% are resistant to clindamycin, 48.7% are resistant to cefoxitin, which indicates resistance to all β -lactam antimicrobial drugs, 16.2% are resistant to ciprofloxacin, 15.4% are resistant to levofloxacin, 7.7% are resistant to linezolid, and 5.3% are resistant to amikacin. **Conclusion.** In the general structure of microorganisms of the hospital, *Staphylococcus aureus* strains prevailed (50%). A high level of sensitivity to amikacin (94.7%), and rifampicin (94.3%), as well as high resistance to penicillin (98.3%) and cefoxitin (48.7%), was noted when studying the sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with various diseases from various biological materials.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; microbiological monitoring; antimicrobial drugs; sensitivity; antibiotic resistance; sputum; blood; urine

For citation: Otamuratova N. Kh., Abdukhalilova G. K., Akhmedova D. R., Tursunova Yu. A. Epidemiological aspects of monitoring the sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 67–74. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-67-74>. EDN: IENPXS. (in Russian)

Введение

Неуклонный рост антибиотикорезистентности среди различных микроорганизмов диктует необходимость проведения целого ряда мероприятий. Одним из ключевых направлений является организация и проведение эпидемиологического надзора, по его результатам можно получить информацию, которая является принципиально важной для оценки масштабов резистентности и модификации терапевтических подходов для надлежащего использования антимикробных препаратов (АМП) [1]. Эпиднадзор за устойчивостью к противомикробным препаратам — это процесс сбора, анализа и сообщения данных, позволяющих оценивать тенденции возникновения и распределения чувствительности и устойчивости к противомикробным препаратам [2].

Растущий уровень тревоги относительно возникновения резистентности клинически значимых патогенов привёл к созданию ряда программ надзора для мониторинга фактического уровня резистентности на местном, региональном и государственном уровнях [3].

Классическим примером распространения устойчивости в микробных популяциях, как известно, являются стафилококки. Современной особенностью стафилококков, независимо от видовой принадлежности, является их высокая устойчивость к антибактериальным препаратам [4].

Staphylococcus aureus известен разнообразными механизмами резистентности к бета-лактамам антибиотикам. В частности, он способен продуцировать классические бета-лактамазы типов А–D. Помимо этого, золотистый стафилококк может приобретать модификации пенициллин-связывающих белков (РВР2а), существенно снижающие их сродство к бета-лактамам; при этом формируется так называемая метициллинорезистентность, проявляющаяся тотальной резистентностью соответствующего штамма ко всем антибиотикам бета-лактаминового ряда [5].

Особенно часто стафилококки обнаруживают в педиатрических стационарах. Ранее считалось, что наибольшую опасность представляет *Staphylococcus aureus*, но в настоящее время известно о значительной роли коагулазонегатив-

ных стафилококков (КНС), вызывающих различные инфекционные процессы [6].

Цель исследования — анализ антибиотикочувствительности *Staphylococcus aureus* при инфекциях различной локализации в детской практике.

Материал и методы

Исследования проводились в рамках Кооперационного соглашения между СДС и Республиканским специализированным научно-практическим медицинским центром эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний (РСНПМЦЭМИПЗ) по проекту № 5NUNGH000089-02-00 «Повышение потенциала Республики Узбекистан по противодействию проблеме устойчивости к антимикробным препаратам». Биологический материал от пациентов из отделений (кровь, моча, мокрота, зев и др.) поступали в бактериологическую лабораторию Республиканского научно-практического медицинского центра педиатрии (Р4), за период с января 2020 г. по декабрь 2022 г. Использовали питательные среды и диски с антимикробными препаратами производство Himedia (Индия).

Чувствительность и интерпретация результатов. Тестирование чувствительности к антибиотикам (ТЧА) проводилось диско-диффузным методом, согласно руководству Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST 2023 г.). Была определена чувствительность всех штаммов к 9 антибактериальным препаратам: цефокситину (FOX), пенициллину (PEN) ципрофлоксацину (CIP), левофлоксацину (LVX), эритромицину (ERY) клиндамицину (CLI), линезолиду (LNZ), рифамицину (RIF), амикацину (AMK). В работе использованы референтные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Полученные результаты чувствительности обрабатывались с использованием программы WHONET и Microsoft Excel в референс лаборатории ЦАМР (Центр Антимикробной резистентности) Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний (РСНПМЦЭМИПЗ).

Результаты и обсуждение

По данным бактериологической лаборатории многопрофильной больницы (Р4), с 2020 г. по 2022 г., поступило 10421 биологических образцов от больных детского контингента с различными заболеваниями (рис. 1). Из всех проведённых исследований только в 4100 (39,3%) случаях был выделен этиологический агент и в 6321 (60,6%) наблюдался отрицательный результат бактериологических исследований.



Рис. 1. Общая высеваемость микроорганизмов по данным бактериологических исследований РСНПМЦП (P4) в детском возрасте за период 2020–2022 гг. (n=10421).

Fig. 1. Total microorganism count according to bacteriological studies of the Republican Specialized Scientific Practice Medical Center of Pediatrics (P4) in children for the period 2020–2022 (N=10421).

Анализируя данные положительных результатов бактериологических исследований, мы видим, что доминирующим возбудителем среди высеянных агентов явился *S. aureus*, что составило 50% от всех выделенных возбудителей (рис. 2). Кроме того, в 10% случаях высевался *Enterococcus spp.* Грамотрицательная флора высевалась от больных из различных биологических материалов: в 16% — *Klebsiella pneumoniae*, в 6% — *Pseudomonas aeruginosa*, в 2% — *E. coli* и 1% — *Acinetobacter baumannii*.

Таким образом, анализ бактериологического пейзажа возбудителей, выделенных от больных лечебного учреждения P4 показывает, что среди

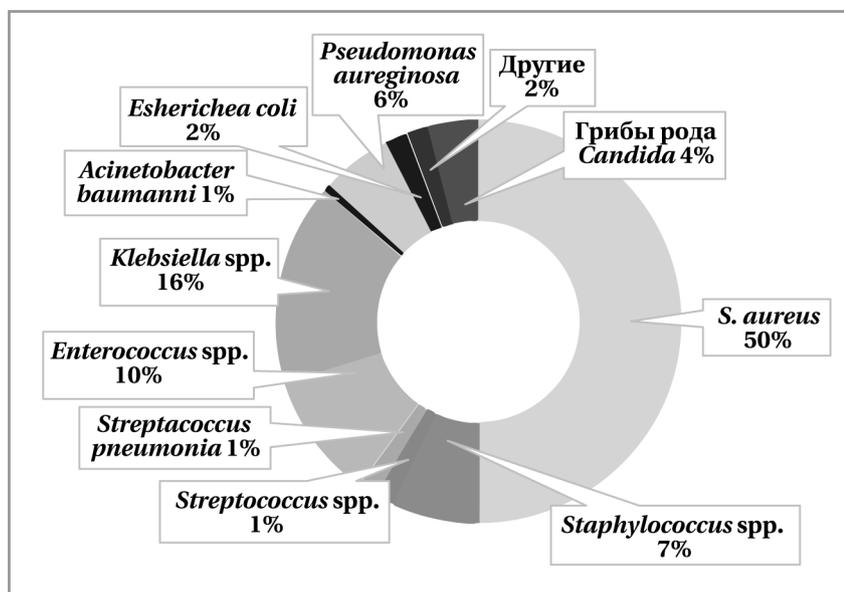


Рис. 2. Динамика высеваемости микроорганизмов, по данным бактериологических исследований P4, у пациентов из разных отделений (n=4100).

Fig. 2. Dynamics of microorganism seeding according to bacteriological studies of P4 in patients from different departments (N=4100).

изученных изолятов, доля высеваемости грамположительной флоры, в частности *S. aureus*, остаётся стабильно высокой в детской практике.

При анализе чувствительности всех выделенных штаммов *S. aureus* (рис. 3), мы наблюдаем высокую резистентность к пенициллину — 98,3% и цефокситину — 48,7%. Данная проблема, связанная с увеличением доли грамположительных кокков и ростом их антибиотикорезистентности, увеличивает значимость контроля за распространением резистентности, а также вопросов ограничения их резистентности и усилением мер по инфекционному контролю. Большую проблему составляют MRSA штаммы *S. aureus*.

Также у *S. aureus* наблюдается увеличение выявления штаммов, резистентных к антимикробным макролидным препаратам: резистентность к эритромицину составила 37,5%, а к клиндамицину 52,6%.

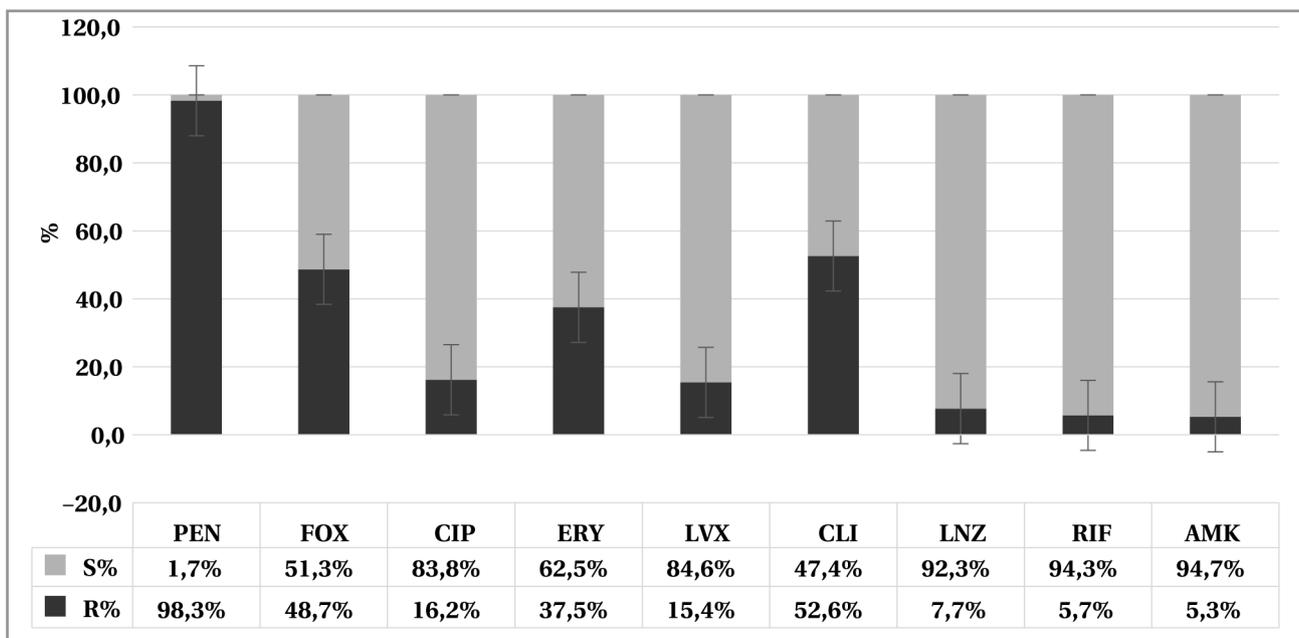
Высокая чувствительность штаммов *S. aureus* наблюдается по отношению к следующим антимикробным препаратам: к амикацину — 94,7%, к рифампицину — 94,3%, к линезолиду — 92,3%, к левофлоксацину — 84,6% и к ципрофлоксацину — 83,8% (см. рис. 3)

Далее нами проанализирована чувствительность штамма *S. aureus* к антимикробным препаратам от больных с различными инфекциями, в зависимости от возрастной категории в сравнительной динамике.

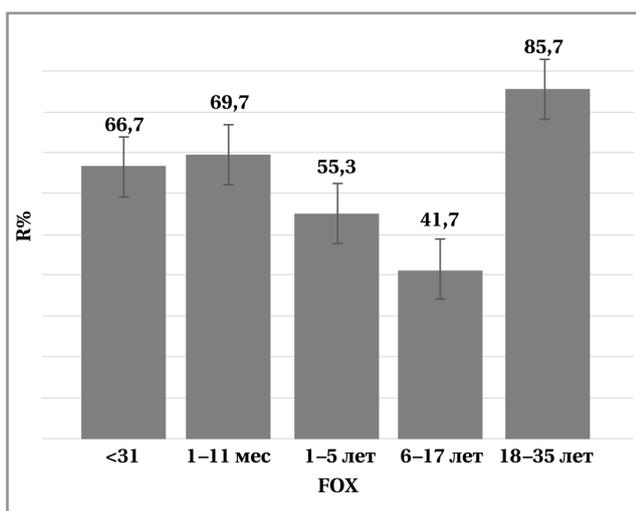
Так, резистентность штамма *S. aureus* к цефокситину варьировала от 41,7–85,7%, соответственно (рис. 4). Наибольшая резистентность наблюдалась

в возрасте от 18–35 лет 85,7%, 1–11 мес. — 69,7%, так же высокая резистентность (66,7%) фиксируется в возрастной группе <31 дней.

Резистентность к АМП макролидового ряда штаммов *S. aureus* наблюдалась у всех возрастных категорий. Так, наибольший уровень встречаемости наблюдается в возрастной категории <31 дней: к клиндамицину 83,3% и 74% резистентности к эритромицину; от 1–11 мес.: к эритромицину — 62,5% и к клиндамицину — 56,3%. В возрасте 1–5 лет и от 6–17 лет резистентность варьировала от 50,8% и 58,6% в зависимости от антимикробного макролидного препарата. Наименьшая резистентность наблюдалась в возрастной категории от 18–35 лет и составляла 33,3%. Данный класс АМП часто применяется при лечении больных с различными инфекциями в независимости от возраста (рис. 5).



**Рис. 3. Профиль резистентности штаммов *Staphylococcus aureus* к противомикробным препаратам (n=1930).
Fig. 3. Resistance profile of *Staphylococcus aureus* strains to antimicrobial drugs (N=1930).**



**Рис. 4. Резистентность штаммов *Staphylococcus aureus* к цефокситину в зависимости от возрастной категории.
Fig. 4. Resistance of *Staphylococcus aureus* strains to ceftiofloxacin depending on age category.**

Для определения чувствительности штаммов *S. aureus* к аминогликозидным АМП в пилотном учреждении РСНПМЦ Педиатрии используют диск с амикацином. Анализ тестирования ТЧА показал, что наибольшая резистентность наблюдалась в возрасте <31 дней — 25,0%, а в возрастной категории 1–5 лет резистентность к амикацину наблюдается только в 9,5%, 1–11 месяцев — в 4,8%, 6–17 лет — в 3,8%, а в возрастной категории 18–35 лет штаммы *S. aureus* обладали 100% чувствительностью (рис. 6).

Несмотря на то, что в протоколах лечения инфекционных заболеваний у детей не прописано

использования АМП фторхинолонового ряда, однако в пилотном учреждении РСНПМЦ Педиатрии практикуется при постановке ТЧА штаммов *S. aureus* определять чувствительность данных возбудителей с применением дисков АМП ципрофлоксацина и левофлоксацина. Анализ ТЧА показал, что наибольшая резистентность штаммов *S. aureus* наблюдалась в возрасте от 1–5 лет и 6–17 лет динамика резистентности варьировала от 8,3% до 36,4% в зависимости от антибактериального препарата.

В возрасте от 1–5 лет резистентность к ципрофлоксацину составляет 36,4%, левофлоксацину — 23,8%. Наибольшая резистентность наблюдалась в возрастной категории 6–17 лет: резистентность к левофлоксацину — 12,5%, и к ципрофлоксацину — 8,3%. В возрастной категории от 1–11 мес. чувствительность к АМП фторхинолонового ряда составила 100% (рис. 7).

Таким образом, резистентность к антимикробным препаратам в зависимости от возрастной категории пациентов варьировала: штаммы *S. aureus*, резистентные к цефотаксиму даже встречались в возрасте <31 дней (66,7%), а в возрасте от 18 до 35 лет встречаемость резистентных штаммов увеличивается до 87,5%. Штаммы *S. aureus*, резистентные к антибактериальным препаратам фторхинолонового ряда, чаще выделялись в возрастной категории от 1–5 лет: к левофлоксацину — 23,8% и к ципрофлоксацину — 36,4% соответственно. Резистентность к макролидам встречалась во всех возрастных категориях, но наибольшая резистентность наблюдалась у детей в возрасте <31 дней к клиндамицину — 83,3% и к эритромицину — 71,4% случаях, также рези-

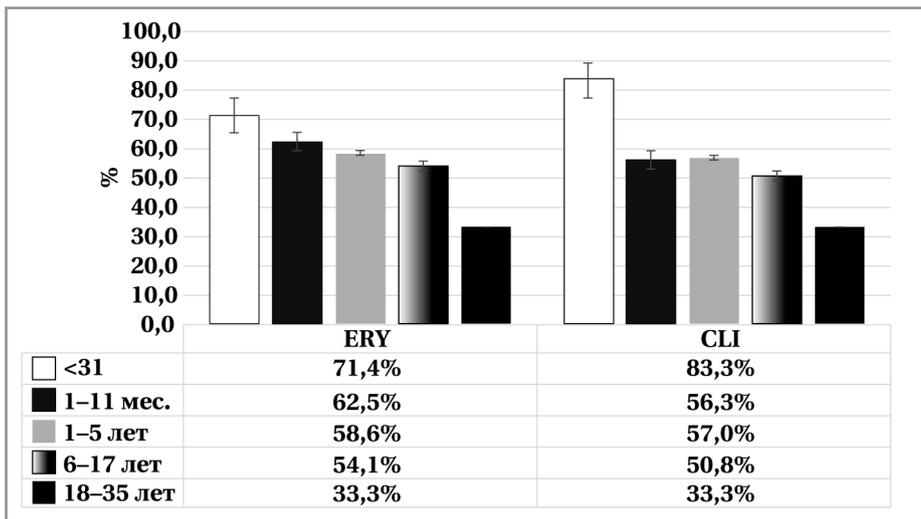


Рис. 5. Резистентность штаммов *Staphylococcus aureus* к макролидным АМП в зависимости от возрастной категории.

Fig. 5. Resistance of *Staphylococcus aureus* strains to macrolide antibiotics depending on age category.

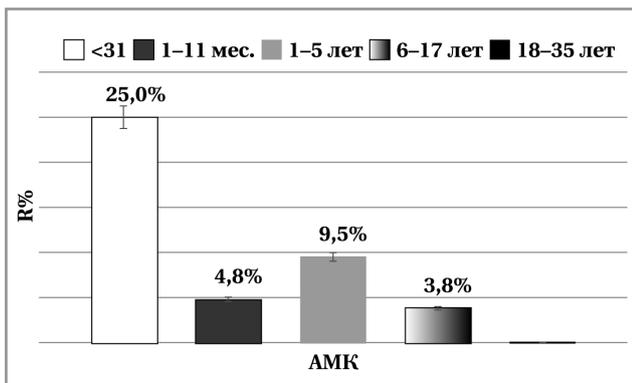


Рис. 6. Резистентность штаммов *Staphylococcus aureus* к аминогликозидным АМП в зависимости от возрастной категории.

Fig. 6. Resistance of *Staphylococcus aureus* strains to aminoglycoside antimicrobial agents depending on age category.

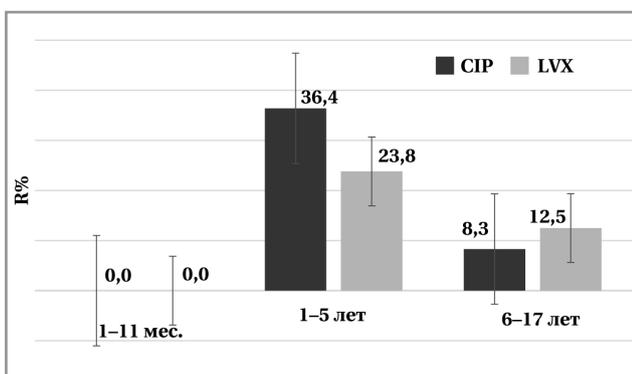


Рис. 7. Резистентность штаммов *Staphylococcus aureus* к АМП фторхинолонового ряда в зависимости от возрастной категории.

Fig. 7. Resistance of *Staphylococcus aureus* strains to fluoroquinolone antimicrobial agents depending on age category.

стентность к амикацину чаще встречалась в этой возрастной категории.

Далее нами было проанализированы данные высеваемости *Staphylococcus aureus* от вида биологического материала, поступившего от больных различных отделений в бактериологическую лабораторию пилотного учреждения РСНПМЦ Педиатрии. Как видно из диаграммы рис. 8, чаще всего высевался *S. aureus* из зева, что составило 81,4%, из мокроты — 10,9%, из носа — 5,6%, из крови — 1,9%, а наименьшее количество высевалось из мочи — 0,2%.

Для сравнительного анализа данных чувствительности штаммов *S. aureus* к АМП были отобраны штаммы, выделенные из зева и крови (рис. 9). Анализ показал, что резистентность к пенициллину штаммов *S. aureus*, выделенных из зева и крови, составила 100%, эти данные могут указывать на недостоверность результатов чувствительности в отношении диска с пенициллином. В таких случаях необходимо рекомендовать бактериологической лаборатории провести валидацию дисков с пенициллином.

Для выявления резистентности к антибактериальным препаратам бета-лактаминового ряда, рекомендовано использовать диски с цефокситину. Данные анализа показали, что наибольшая резистентность наблюдалась у штаммов *S. aureus*,

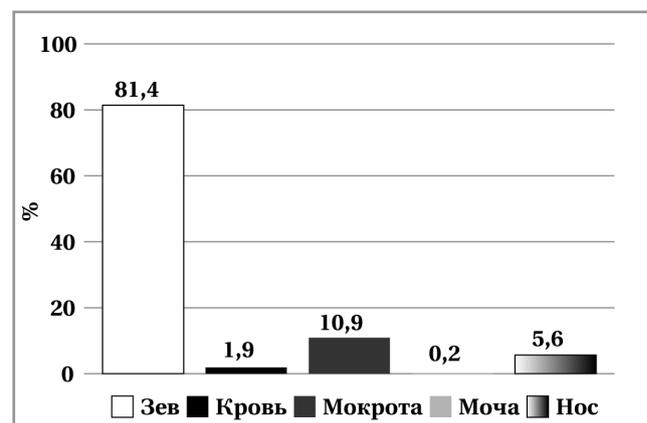


Рис. 8. Динамика высеваемости *Staphylococcus aureus* в зависимости от биологического материала.

Fig. 8. Dynamics of *Staphylococcus aureus* seeding depending on the biological material.

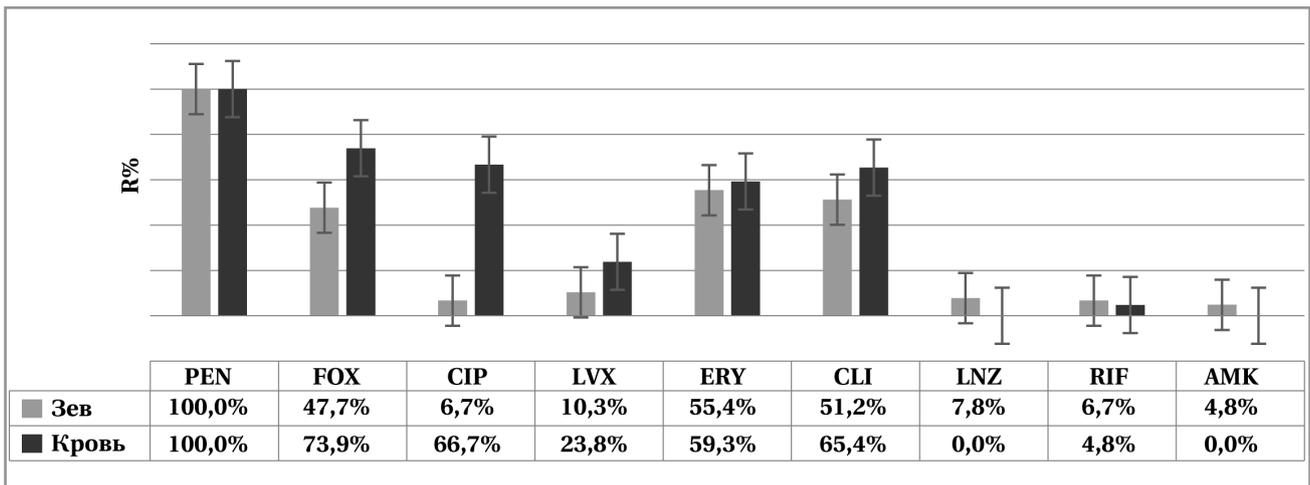


Рис. 9. Динамика резистентности *Staphylococcus aureus* в зависимости от биологического материала.
 Fig. 9. Dynamics of *Staphylococcus aureus* resistance depending on the biological material.

выделенных из крови (73,9%), у выделенных из зева резистентность наблюдалась только в 47,7% случаях.

К антимикробным препаратам фторхинолонового ряда резистентность штаммов *S. aureus* встречалась в наибольшем количестве при выделении из крови — 66,7%, а наименьшая резистентность наблюдалась из зева — 6,7%.

В независимости от биологического материала резистентность к макролидным антимикробным препаратам штаммов *S. aureus* варьировала от 51,1% до 65,4% и к амикацину от 4,8–8,3%.

7,8% штаммов *S. aureus*, выделенные из зева, имели резистентность к линезолиду, а штаммы, выделенные из крови, в 100% были чувствительные. Также у 6,7% у штаммов, выделенных из зева, наблюдалась резистентность к рифампицину.

Таким образом, штаммы *S. aureus*, выделенные из крови, обладали высокой резистентностью к широко используемым антимикробным препаратам при лечении сепсиса.

Анализ чувствительности штаммов *S. aureus* показал, что в пилотном учреждении РСНПМЦ Педиатрии локальная антибиотикограмма

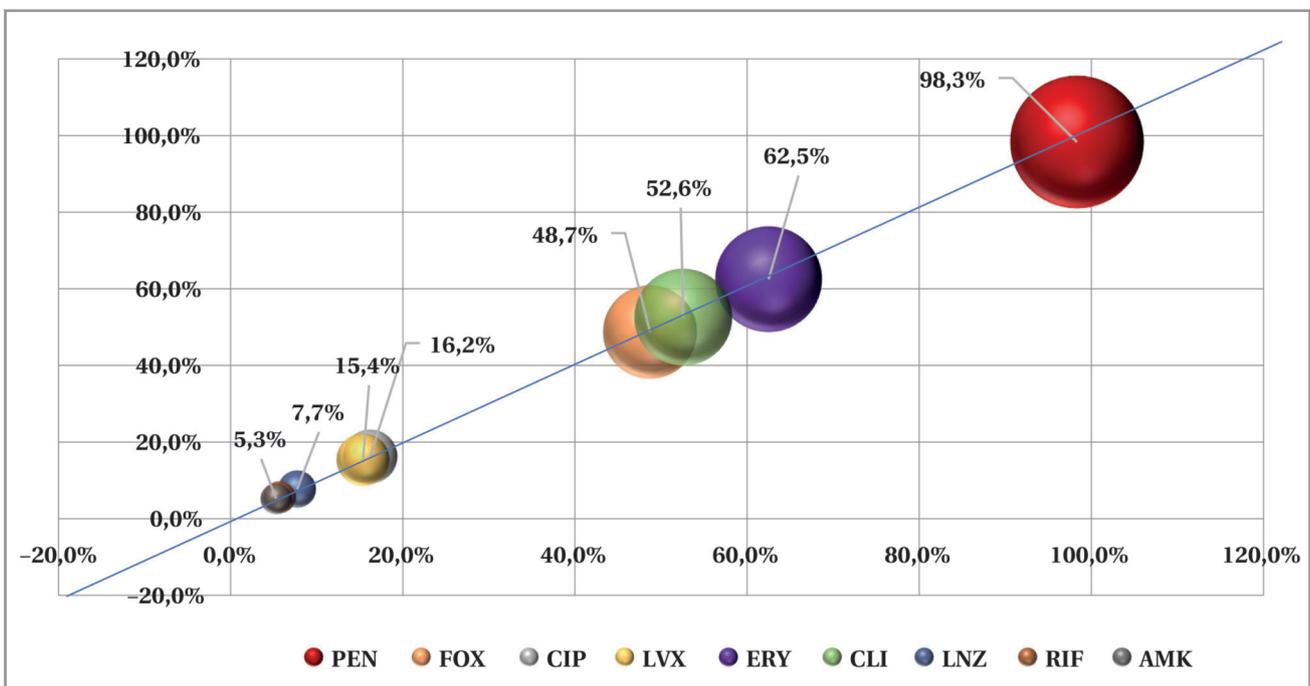


Рис. 10. Антибиотикограмма штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от больных из лечебного учреждения П4.
 Fig. 10. Antibioticogram of *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients from P4 medical institution.

штамма *S. aureus* имеет следующую картину: в 98,3% случаев была установлена резистентность к пенициллину, в 62,5% — к эритромицину, в 52,6% — к клиндамицину, в 48,7% — к цефокситину, что указывает на резистентность ко всем бета-лактамам антимикробным препаратам, в 16,2% — к ципрофлоксацину, в 15,4% — к левофлоксацину, в 7,7% — к линезолиду и в 5,3% — к амикацину (рис. 10).

Заключение

Эпидемиологической особенностью является преобладание штаммов *S. aureus* (50%) в общей структуре микроорганизмов стационара. При изучении чувствительности штаммы *S. aureus*, выделенных от больных с различными заболеваниями из различных биологических материалов, был установлен высокий уровень чувствительности к амикацину (94,7%) и рифампицину (94,3%), тогда как высокая резистентность отмечалась к пенициллину (98,3%) и цефокситину (48,7%).

Динамика резистентности штаммов *S. aureus* в зависимости от возрастной категории, наибольшая резистентность к цефокситину отмечалась у взрослых в возрасте от 18–35 лет 85,7%, а среди детей в возрастной категории от 1 до 11 мес. — 69,7%.

Наибольшая высеваемость *S. aureus*, в зависимости от биологического материала отмечена из зева (81,4%), мокроты (10,9%) и крови (1,9%) соответственно. Наибольшая резистентность к

антимикробным препаратам в зависимости от биологического материала отмечалось у штаммов, выделенных из крови от 4,8% до 100%, в зависимости от антимикробного препарата.

Можно сказать, что знания о ведущей микрофлоре и об уровне антибиотикочувствительности ориентируют врачей на назначение рациональной эмпирической антибиотикотерапии больным до получения данных чувствительности и являются базой для разработки алгоритмов рационального антибактериального лечения в стационаре [7].

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование имело спонсорскую поддержку: исследования проводились в рамках Кооперационного соглашения между СДС и Республиканским специализированным научно-практическим медицинским центром эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний (РСНПМЦЭМИПЗ) № 5NUNGH000089-02-00 «Повышение потенциала Республики Узбекистан по противодействию проблеме устойчивости к антимикробным препаратам».

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. *Отамуратова Н. Х., Абдухалилова Г. К.* — концепция и дизайн исследования, *Ахмедова Д. Р.* — редоктирование.

Литература/References

1. *Виноградова А. Г., Кузменков А. Ю.* Организация данных как основа локального мониторинга антибиотикорезистентности. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020; 22 (2): 137–141. [Vinogradova A. G., Kuzmenkov A. Yu. Organizatsiya dannykh kak osnova lokal'nogo monitoringa antibiotikorezistentnosti. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2020; 22 (2): 137–141. (in Russian)]
2. ВОЗ Европейское региональное бюро. Эпиднадзор за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Восточной Европе. Ежегодный доклад, 2019. [VOZ Evropejskoe regional'noe byuro. Epidnadzor za ustojchivost'ju k protivomikrobnym preparatam v Tsentral'noj Azii i Vostochnoj Evrope. Ezhegodnyj doklad, 2019. (in Russian)]
3. *Салманов А. Г., Толстанов А. К., Мариевский В. Ф., Бойко В. В., Тарабан И. А.* Эпидемиологический надзор за резистентностью к антимикробным препаратам. Новости Хирургии. 2012; 20 (6): 93–101. [Salmanov A. G., Tolstanov A. K., Marievskij V. F., Bojko V. V., Taraban I. A. Epidemiologicheskij nadzor za rezistentnost'ju k antimikrobnym preparatam. Novosti Khirurgii. 2012; 20 (6): 93–101. (in Russian)]
4. *Годинская Н. А., Беляева Е. В., Борискина Е. В., Кряжева Д. В.* Проблема антибиотикорезистентности стафилококков в педиатрических стационарах. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020; 22 (4): 272–275. [Godinskaya N. A., Belyaeva E. V., Boriskina E. V., Kryazheva D. V. Problema antibiotikorezistentnosti stafilokokkov v peditricheskikh stacionarakh. Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya. 2020; 22 (4): 272–275. (in Russian)]
5. *Жильцов И. В.* Наука и инновации в медицине. 2020; 5 (2): 83–87. [Zhil'tsov I. V. Nauka i innovatsii v meditsine. 2020; 5 (2): 83–87. (in Russian)]
6. *Годинская Н. А., Беляева Е. В., Борискина Е. В., Кряжева Д. В.* Проблема антибиотикорезистентности стафилококков в педиатрических стационарах. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020; 22 (4): 272–275. [Godinskaya N. A., Belyaeva E. V., Boriskina E. V., Kryazheva D. V. Problema antibiotikorezistentnosti stafilokokkov v peditricheskikh stacionarakh. Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya. 2020; 22 (4): 272–275. (in Russian)]
7. *Земко В. Ю., Окулич В. К., Дзядзько А. М.* Мониторинг антибиотикорезистентности микроорганизмов в отделении реанимации и интенсивной терапии многопрофильного стационара. Трансплантология. 2018; 4: 284–297. [Zemko V. Yu., Okulich V. K., Dzyadz'ko A. M. Monitoring antibiotikorezistentnosti mikroorganizmov v otdelenii reanimatsii i intesivnoj terapii mnogoprofil'nogo stacionara. Transplantologiya. 2018; 4: 284–297. (in Russian)]

Поступила / Received 04.06.2024
Принята в печать / Accepted 10.07.2024

Информация об авторах

Отамуратова Наргиза Хасанджановна — к. м. н., докторант Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний; Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Республика Узбекистан. ORCID ID: 0009-0008-7288-3988

Абдухалилова Гульнора Кудратуллаевна — д. м. н., руководитель центра антимикробной резистентности Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний; Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Республика Узбекистан. ORCID ID: 0009-0003-6042-0306

Ахмедова Дильшода Рахманбердиевна — к. м. н., старший научный сотрудник Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний, Ташкент, Республика Узбекистан. ORCID ID: 0000-0002-4198-6051

Турсунова Ю. А. — Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр педиатрии, Ташкент, Узбекистан

About the authors

Nargiza Kh. Otamuratova — Ph. D. in Medicine, doctoral candidate, Republican Specialized Scientific-Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology and Infectious Diseases; Tashkent Medical Academy, Tashkent, Uzbekistan. ORCID: 0009-0008-7288-3988

Gulnora K. Abdukhalilova — D. Sc. in Medicine, Head of the Center for Antimicrobial Resistance, Republican Specialized Scientific-Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology and Infectious Diseases; Tashkent Medical Academy, Tashkent, Uzbekistan. ORCID: 0009-0003-6042-0306

Dilshoda R. Akhmedova — Ph. D. in Medicine, Senior Researcher, Republican Specialized Scientific-Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology and Infectious Diseases, Tashkent, Uzbekistan. ORCID: 0000-0002-4198-6051

Yu. A. Tursunova — Republican Specialized Scientific Practice Medical Center of Pediatrics of Health Ministry of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

Опыт применения NPWT-терапии и субстратного антигипоксанта в лечении полиморбидного пациента пожилого возраста (клиническое наблюдение)

М. В. ВАРГАНОВ

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» МЗ РФ, Ижевск, Россия

Резюме

Представлено клиническое наблюдение пожилого полиморбидного пациента с осложнённым течением основного заболевания, приведшим к расширенному объёму хирургического вмешательства. Показана эффективность включения в схемы комплексного лечения NPWT-терапии (NPWT — системы в режиме 120–160 мм рт. ст., курс 7 дней) и инфузий 1,5% реамберина (400,0, внутривенно капельно, ежедневно, общий курс № 6), что проявлялось в ускорении репаративных процессов и уменьшении площади раневой поверхности и способствовало стабилизации общего состояния больного: уменьшению выраженности клинической симптоматики и сосудистых нарушений. Полученные результаты могут послужить основанием для проведения более углублённого исследования в данном направлении.

Ключевые слова: полиморбидность; сочетанная патология; NPWT-терапия; 1,5% раствор меглюмина натрия сукцината; пожилой возраст

Для цитирования: Варганов М. В. Опыт применения NPWT-терапии и субстратного антигипоксанта в лечении полиморбидного пациента пожилого возраста (клиническое наблюдение). *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 75–79. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-75-79>. EDN: ZRUZWI.

The Use of Negative Pressure Wound Therapy and Substrate Antihypoxant in the Treatment of an Elderly Polymorbid Patient (Clinical Observation)

MIKHAIL V. VARGANOV

Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia

Abstract

The article presents a clinical observation of an elderly polymorbid patient with a complicated course of the underlying disease, which led to an expanded scope of surgical intervention. The effectiveness of inclusion in the complex treatment regimens of negative pressure wound therapy (NPWT systems in the mode of 120–160 mm Hg, 7-day course) and 1.5% reamberin infusions (400.0, intravenous drip, daily, general course No. 6) is shown. It manifested in the acceleration of reparative processes and a decrease in the area of the wound surface and contributed to the stabilization of the general condition of the patient: a decrease in the severity of clinical symptoms and vascular disorders. The obtained results can serve as a basis for a more in-depth study in this direction.

Keywords: polymorbidity; combined pathology; NPWT; 1.5% solution of meglumine sodium succinate; elderly

For citation: Varganov M. V. The use of negative pressure wound therapy and substrate antihypoxant in the treatment of an elderly polymorbid patient (clinical observation). *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (11–12): 75–79. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-75-79>. EDN: ZRUZWI. (in Russian)

Введение

Одной из актуальных проблем ведения геронтологических пациентов является полиморбидность. Установлено, что среди людей старше 65 лет порядка 2/3 имеют два и более хронических заболевания. Взаимное влияние патологии может

изменять её классическую клиническую картину, характер течения, увеличивать количество осложнений и их тяжесть и ухудшать качество жизни пожилого больного и прогноз его состояния. Считается, что патофизиологическая основа взаимосвязи старения и полиморбидности — вялотеку-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: varganov_mixail@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: varganov_mixail@mail.ru

щее системное воспаление и структурно-функциональные изменения в иммунной системе [1].

Кроме того, эти пациенты имеют высокий риск госпитализации, а наличие нескольких хронических заболеваний требует многоплановой терапии. К сожалению, имеющиеся протоколы лечения зачастую противоречат друг другу, что также существенно осложняет алгоритм ведения таких пациентов. В связи с этим, несмотря на разработанные схемы и широкий спектр рекомендуемых лекарственных препаратов сохраняется низкая эффективность лечения полиморбидной патологии у пожилых больных [2, 3].

В данной ситуации важное значение приобретает терапия сопровождения, способствующая уменьшению выраженности воспалительных реакций и гипоксии тканей и переключению энергоэффективных путей синтеза энергии на анаэробный гликолиз. Одним из методов, хорошо себя зарекомендовавшим в этом направлении, является лечение ран отрицательным давлением (Negative Pressure Wound Treatment, NPWT). Его принцип основан на использовании закрытой дренажной системы, поддерживающей контролируемое отрицательное давление в области раны что способствует созданию в зоне повреждения благоприятных условий для очищения раневого ложа и созреванию «здоровых» грануляций с последующим их закрытием местными тканями. Кроме того отмечено, NPWT-терапия положительно влияет на все стадии раневого процесса за счёт усиления местного кровотока, снижения выраженности раневой экссудации, что в свою очередь способствуют увеличению интенсивности клеточной пролиферации, усилению синтеза коллагена и протеинов, а активная аспирация создает поток жидкости, направленный из тканей, что способствует элиминации микробных тел и токсинов и препятствует проникновению микроорганизмов в глубже лежащие ткани [4].

Для нормализации энергетического клеточного обеспечения, подавления синтеза провоспалительных медиаторов, предупреждения избыточного иммунного ответа и нарушений в системе гемостаза возможно применение экзогенного сукцината, оказывающего опосредованное положительное влияние на уровень микроциркуляторного кровотока, что связано с ускорением оборота дикарбоновой части цикла Кребса в эндотелиоцитах за счёт снижения выраженности внутриклеточного ацидоза и уровня пирувата и лактата. Одним из таких препаратов является 1,5% кристаллоидный раствор меглюмина натрия сукцината (Реамберин 1,5%, «ООО «НТФФ ПОЛИСАН»). Под его действием повышаются антиоксидантные и антигипоксантные возможности организма и снижается интенсивность процессов перекисного окисления липидов. Реамберин

способен проникать в клетки и нормализовать энергетический обмен, активизировать ферментативные процессы цикла Кребса и тем самым способствуя утилизации жирных кислот и глюкозы клетками, нормализации кислотно-щелочного баланса и газового состава крови. Препарат хорошо переносится больными и зарекомендовал себя в интенсивной терапии и хирургии [5–7].

Цель исследования: на примере клинического случая лечения пожилого пациента с полиморбидной патологией и осложнённым течением проанализировать эффективность включения в схемы NPWT-терапии и инфузий 1,5% раствора меглюмина натрия сукцината.

Клинический случай

Пациент Б. 65 лет, поступил в пульмонологическое отделение БУЗ УР 1 РКБ МЗ УР 10.04.2024 с жалобами на одышку смешанного характера при минимальной физической активности, болевой синдром в грудной клетке спереди, тяжесть, хрипы и периодические свисты в грудной клетке.

При поступлении был сформирован диагноз: диффузное интерстициальное поражение лёгких по типу гиперчувствительного пневмонита, нефибротический фенотип, осложнение: ХДН1, сопутствующие: бронхиальная астма, атопическая, персистирующее течение средней степени тяжести, обострение средней степени тяжести, хроническая обструктивная болезнь лёгких, ограничение скорости воздушного потока средней степени тяжести (GOLD II). Течение заболевания с выраженными симптомами (mMRS 2 балла), редкими обострениями (менее 2 раз в год). Эмфизематозный фенотип. Эмфизема лёгких. ИК=23 п/лет. Спонтанная крапивница. Псориаз вне обострения.

Анамнез жизни не уточнён, социально-значимые заболевания пациент отрицал. При поступлении были отмечены существенные отклонения в иммунограмме: (11.04.24) снижение уровня CD3 — 70,09% (0,51×10⁹/л), CD4 — 33,49% (0,24×10⁹/л), CD8 — 36,98% (0,27×10⁹/л), соотношение CD4/CD8 — 0,91, CD19 В-лимфоциты — 16,47% (0,12×10⁹/л).

Исходя из клинико-лабораторных данных была назначена терапия: ванкомицин (500 мг в/в 4 р/д), феноферол 250/500 мг, метронидазол 500 мг 3 р/д, торасемид таблетки 10 мг, инфузионно раствор калия хлорида 4% 20 мл, спиринолактон таблетки 50 мг утро, бисептол 480 мг 4 р/д. На фоне лечения отмечалась положительная динамика по дыхательной недостаточности, снижение потребности в кислородной поддержке.

На 6-е сутки госпитализации (15.04.2024) появился жидкий стул со слизью и зеленью от 4 до 10–12 раз в день в связи с чем был установлен диагноз: хронический антибиотикоассоциированный энтероколит, обострение. На следующий день (16.04.2024.) появились боли в животе, на УЗИ была определена жидкость в брюшной полости. В лабораторных показателях были отмечены: лейкоцитоз — до 26×10⁹/л, увеличение уровня креатинина — до 286 мкмоль/л, мочевины — до 30 ммоль/л.

Объективно: состояние пациента расценивалось как тяжёлое, сознание ясное, контакту был доступен, дыхание самостоятельное через маску с увлажнённым кислородом, Язык суховат, АД 90/60. Живот равномерно вздут, мягкий, болезненный в эпи- и мезогастральной областях, опухолевидных образований не пальпировалось. Симптомы раздражения брюшины были расценены как сомнительные.

На фоне ухудшения состояния по совокупности клинических и лабораторных данных консилиум хирургов принял решение об экстренной лапаротомии. Был поставлен предварительный диагноз: Мезентериальный тромбоз? Перитонит

неясной этиологии. Во время оперативного вмешательства в брюшной полости был обнаружен мутный выпот, отёчность забрюшинной клетчатки, раздутые петли кишечника и признаки динамической кишечной непроходимости. Брюшная полость была санирована, установлен дренаж в полость малого таза и послойное ушивание брюшной полости.

В послеоперационном периоде на фоне проводимого консервативного лечения 2.05.2024 было отмечено ухудшение состояния, появление мутного гнойно-геморрагического отделяемого из раны и эвентрация, в связи с чем было проведено послойное ушивание раны передней брюшной стенки.

В связи с отрицательной динамикой и по совокупности клиничко-лабораторных данных пациент был переведён в хирургическое отделение с диагнозом: Инфицированная гематома брюшной стенки. Полиорганная недостаточность. Кишечное кровотечение. Выраженные белково-электролитные нарушения. Сепсис.

В последующем отмечалась повторные эвентрации 09.05.24. и 20.05.24. Производилось их ушивание с наложением временной системы закрытия брюшной полости (NPWT — системы в режиме 120–160 мм рт. ст. на протяжении всего периода) в течение 7 дней и дальнейшим использованием повязок с мазью левомеколь. Проведён курс инфузий реамберина: 400,0 в/в, капельно, ежедневно в течение 5 дней. Пациент получал комплексное лечение, включающее в себя антибактериальную, трансфузионную, метаболическую, антиагрегантную терапию с использованием препаратов: ципрофлоксацин, цефепим, меропенем, поликсим В, биопенем, флуконазол, метронидазол, дексаметазон, ванкомицин, фуросемид, тораемид, биспролол, ацетилсалициловая кислота, клопидогрел, эноксапарин, калия хлорид, метоклопрамид, биспролол, лозартан, альбумин, спиронолактон, кеторолак, трамадол, инфузионная симптоматическая, патогенетическая терапия, кабивен, ондасетрон.

На 46-е сутки госпитализации в стационар (23.05.24) было отмечено развитие отёка нижних конечностей. На УЗ-доплерографии вен нижних конечностей были выявлены: восходящий окклюзирующий тромбоз глубоких вен бедра и голени правой конечности с флотирующей головкой тромба в наружной подвздошной вене до 15 см, неокклюзирующий тромбоз подколенной вены слева. Отёк подкожной клетчатки обеих нижних конечностей. 24.05.2024 при проведении исследования получен положительный тест ПЦР на COVID-19.

В клиничко-биохимических анализах от 24.05.24. выявлены: лейкоциты — $10,1 \times 10^9/\text{л}$ без сдвига формулы влево; белок — 39 г/л; мочевины — 6,0 ммоль/л; калий — 2,8 ммоль/л; креатинин — 162,7 мкмоль/л; альбумин — 27,1 г/л; глобулин — 11,9 г/л; билирубин — 12 мкмоль/л; АСТ — 8,4 ед.; АЛТ — 6,3 ед. Комплексная терапия была продолжена.

На 5-й день отёка (27.05.24.) состояние больного ухудшилось: при сохранении сознания контакт стал малодоступен, оценка уровня сознания по шкале Глазго составила 13 баллов (периодически отвечал на вопросы мимикой и жестами, жалоб на боли в животе не предъявлял, двигался с трудом в кровати). Объективно: астеничного телосложения, выраженная гипотрофия подкожно-жировой клетчатки, склеры инъецированы, кожные покровы бледные, сухие, на коже кистей, предплечий появились множественные кровоизлияния фиолетового цвета (экхимозы) (рис 1); на коже грудной клетки, брюшной стенки — петехиальные кровоизлияния. Отмечено уменьшение периферических отёков на нижних конечностях. Видимые слизистые оболочки физиологической окраски. Периферические лимфатические узлы не пальпируются.

Больной находился на ИВЛ, сатурация 98%. При аускультации лёгких дыхание везикулярное жёсткое, ослаблено в базальных отделах, хрипы с обеих сторон. Перкуторно границы сердца не изменены. Аускультативно тоны сердца приглушены. ЧСС 120–137 в мин. АД 84/62 мм рт. ст. Язык влажный. Живот мягкий, равномерно поддут, слабо болезненный в области послеоперационной раны при глубокой пальпации. Селезёнка



Рис. 1. Петехиальные кровоизлияния на коже кистей и предплечья.

Fig. 1. Petechial hemorrhages on the skin of the hands and forearms.

не пальпировалась, симптомы раздражения брюшины были отрицательные, выслушивались шумы перистальтики кишечника. Область проекции почек внешне не была изменена, симптом поколачивания поясничной области отрицателен с обеих сторон. Менингеальные симптомы отрицательны. Температура тела $37,4^\circ$. Мочепускание через уретральный катетер, моча жёлтого цвета, слегка мутная. Стул отсутствовал.

При проведении ЭКГ были выявлены признаки инфаркта миокарда передне-перегородочной области в подострой стадии; ЧСС — 140. На ЭхоКГ — НМК I; НТК I; атеросклероз аорты. Систолическая функция ЛЖ снижена. Гипокинезия передне-перегородочной стенки ЛЖ. Тахикардия. На КТ органов грудной клетки выявлены: тромботические массы в верхне- и нижнедолевой ветвях лёгочной артерии справа без видимой окклюзии на момент исследования. Фрагментарное контрастирование сегментарных, субсегментарных ветвей левой лёгочной артерии на уровне S8, S9, не исключён тромбоз. В биохимических анализах крови (27.05.24.) были выявлены: положительная реакция на тропонин и миоглобин, отрицательный — КФК-МВ, лейкоцитоз — до $13 \times 10^9/\text{л}$ (сегментоядерные — 77%; моноциты — 4%; лимфоциты — 19%). Таким образом, у пациента отмечено нарастание сосудистой симптоматики, развитие ТЭЛА и инфаркта миокарда.

28.05.24. вновь происходит эвентрация, в связи с чем было проведено ушивание с наложением П-образных швов на кожу лапаротомной раны. Проведён повторный курс NPWT-терапии (рис. 2) в течение 6 дней и инфузии 1,5% раствора реамберина по 400 мл внутривенно 1 раз в день в течение 5 дней. Во время проведения вакуум-терапии дебит по дренажу составлял 100–150 мл серозного мутного отделяемого в сутки. После снятия системы отмечено улучшение состояния раневой поверхности с выделением небольшого количества мутного серозно-геморрагического отделяемого (рис. 3). В дальнейшем была наложена повязка с мазью офломелид.

Лабораторные показатели от 03.06.24.: гемоглобин — 75 г/л; лейкоциты — $7 \times 10^9/\text{л}$; белок — 42 г/л; АЧТВ — нет коагуляции; МНО — 1,1; фибриноген — 2,7 г/л; мочевины — 4,5 ммоль/л; креатинин — 114 мкмоль/л.

Пациенту была продолжена консервативная терапия (аминокислотные смеси — кабивен, калия хлорид эноксапарин, биспролол, лозартан метоклопрамид, ондасетрон, энтеральное питание смеси фрезениус, диосмектин, бифидумбактерин), местное лечение раневого дефекта, клиничко-лабораторный и инструментальный мониторинг в условиях отделения интенсивной терапии до 1.07.24., далее при стабилизации состояния больной был переведён в хирургическое отделение.

В удовлетворительном состоянии пациент был выписан 15.07.24. на амбулаторное наблюдение и лечение.

На момент выписки кожные покровы очистились без пигментации, выделений из раны не отмечалось, раневой дефект составил 8×6 см, был покрыт грануляциями с краевой эпителизацией. В лабораторных анализах (14.07.24) отмечена выраженная положительная динамика: АСТ — 8,3 ед/л; АЛТ — 10,4 ед/л; билирубин общий — 11,2 мкмоль/л; белок — 44 г/л; альбумин — 25,8 г/л; глобулин — 18,2 г/л; тропонин миоглобин КФК — отрицательные; ПТИ — 88%; фибриноген — 2,9 г/л; лейкоциты — $7,89 \times 10^9$ г/л; гемоглобин — 91 г/л; тромбоциты — 241 тыс/мкл. По данным инструментальных обследований: СКТ (08.07.24.) — данных за ТЭЛА нет, правосторонний базальный плеврофиброз, диффузный бронхит, поствоспалительные изменения в обоих лёгких. ЭхоЭКГ (12.07.24) — нарушений сократимости левого желудочка нет, ФВ 60%, недостаточность аортального клапана 2 ст, атеросклероз аорты, склероз аортального клапана.

Обсуждение

Представлено клиническое наблюдение пожилого пациента с полиморбидным фоном (бронхиальной астмой, ХОБЛ, эмфиземой и псо-риазом вне обострения) и диффузным интерстициальным поражением лёгких по типу гиперчувствительного пневмонита (нефибротический фенотип). На фоне проводимой терапии основного заболевания у пациента развились осложнения: обострением хронического энтероколита и мезентриальный тромбоз, потребовавший хирургического вмешательства. При его проведении обращала на себя внимание длительно сохранявшаяся несостоятельность швов с развитием повторяющихся эвентраций кишечника, что возможно являлось проявлением выраженных метаболических и гипоксических тканевых нарушений — подавленной регенерацией на фоне тяжёлого расстройства микроциркуляции и генерализованного поражения эндотелия сосудов. Для решения данной проблемы были применена схема, сочетающая NPWT-терапию местно и внутривенное введение антигипоксанта, обеспечивающего метаболическую поддержку, — 1,5% раствора реамберина. Данная схема хорошо зарекомендовала себя при использовании в терапии ран разной этиологии [1–3]. В данном случае также отмечалась положительная динамика в состоянии раневой поверхности — прекращение эвентраций, прекращение инфекционно-воспалительных нарушений (гнойно-серозного отделяемого), появление грануляций и уменьшение размеров раневой поверхности.

При оценке эффективности терапии в конкретном клиническом случае учитывалась тяжесть состояния пациента, обусловленная как возрастными иммунологическими особенностями, так и метаболическими нарушениями и тканевой гипоксией, что проявилось развитием сосудистой патологии — тромбозами, признаками ТЭЛА и инфарктом миокарда передне-перегородочной области.



Рис. 2. Вакуумная система на лапаротомной ране.
Fig. 2. Vacuum system on the laparotomy wound.



Рис. 3. Состояние раны после снятия вакуумной системы.
Fig. 3. The condition of the wound after removal of the vacuum system.

Заключение

У пожилого пациента с полиморбидностью и осложнённым течением основного заболевания и расширенным объёмом хирургического вмешательства показана эффективность включения в схемы комплексного лечения NPWT-терапии и инфузий 1,5% реамберина, что проявлялось в ускорении репаративных процессов (увеличении грануляций и уменьшении площади раневой поверхности), а также улучшение метаболических процессов. При этом назначение 1,5% реамберина в объёме 400 мл, внутривенно капельно, ежедневно курсами в течение 6 дней способствовало также стабилизации общего состояния что проявлялось в уменьшении выраженности клиниче-

ской симптоматики сосудистых нарушений. Полученные результаты могут послужить основанием

для проведения более углублённого исследования в данном направлении.

Литература/References

1. Севостьянова Е. В., Николаев Ю. А., Поляков В. Я. Проблема полиморбидности в современной терапевтической клинике. Бюллетень сибирской медицины. 2022; 21 (1): 162–170. doi: <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-1-162-170>. [Sevostyanova E. V., Nikolaev Yu. A., Polyakov V. Ya. The problem of multimorbidity in a modern therapeutic clinic. Bulletin of Siberian Medicine. 2022; 21 (1): 162–170. doi: <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-1-162-170>. (in Russian)]
2. Тарловская Е. И. Коморбидность и полиморбидность – современная трактовка и насущные задачи, стоящие перед терапевтическим сообществом. Кардиология. 2018; 58 (S9): 29–38. doi: <https://doi.org/10.18087/cardio.2562>. [Tarlovskaya E. I. Comorbidity and polymorbidity – modern interpretation and urgent tasks facing the therapeutic community. Cardiology. 2018; 58 (S9): 29–38. doi: <https://doi.org/10.18087/cardio.2562>. (in Russian)]
3. Ширинский В. С., Ширинский И. В. Полиморбидность, старение иммунной системы и системное вялотекущее воспаление — вызов современной медицине. Медицинская иммунология. 2020; 22 (4): 609–624. doi: <https://doi.org/doi:10.15789/1563-0625-PAO-2042>. [Shirinsky V. S., Shirinsky I. V. Polymorbidity, ageing of immune system and low-grade systemic inflammation: a challenge for modern medicine. Medical Immunology. 2020; 22 (4): 609–624. doi: <https://doi.org/doi:10.15789/1563-0625-PAO-2042>. (in Russian)]
4. Оболенский В. Н., Ермолов А. А., Аронов Л. С., Родоман Г. В., Серов Р. А. Применение метода локального отрицательного давления в комплексном лечении острых гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей. Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. 2012; 1: 50–55. [Obolenskij V. N., Ermolov A. A., Aronov L. S., Rodoman G. V.,

5. Серов Р. А. Application of the method of local negative pressure in the complex treatment of acute purulent-inflammatory diseases of soft tissues. Hirurgija. Zhurnal im. N. I. Pirogova. 2012; 1: 50–55. (in Russian)]
5. Варганов М. В., Микличев А. А., Ларин В. В. Опыт сочетанного применения NPWT-терапии и инфузии реамберина в терапии несостоятельности швов гастроэнтероанастомоза после резекции желудка. Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. 2019; (8): 91–94. doi: <https://doi.org/10.17116/hirurgia201908191>. [Varganov M. V., Miklichev A. A., Larin V. V. Npwt-therapy combined with reamberin infusion for gastroenterostomy failure after stomach resection. Pirogov Russian Journal of Surgery. 2019; (8): 91–94. doi: <https://doi.org/10.17116/hirurgia201908191>. (In Russian)]
6. Микличев А. А., Варганов М. В., Кузьяев М. В., Шамишурина А. А. Сочетанное применение NPWT-терапии и инфузии реамберина в лечении трофической язвы нижней конечности (клиническое наблюдение). Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. 2019; (1): 101–104. doi: <https://doi.org/10.17116/hirurgia2019011101>. [Miklichev A. A., Varganov M. V., Kuzyaev M. V., Shamshurina A. A. Combined application of NPWT-therapy and reamberin infusion in treatment of lower limb trophic ulcer (clinical case). Pirogov Russian Journal of Surgery. 2019; (1): 101–104. doi: <https://doi.org/10.17116/hirurgia2019011101>. (in Russian)]
7. Реамберин: клинические и экспериментальные исследования. Реферативный сборник научных работ, процитированных в PubMed. Под ред. Белова В. Г., СПб.: 2013; 288. [Reamberin: clinical and experimental studies. Abstract collection of scientific papers cited in PubMed. Belov V. G. (ed.), SPb.: 2013; 288. (in Russian)]

Поступила / Received 08.11.2024

Принята в печать / Accepted 18.11.2024

Информация об авторах

Варганов Михаил Владимирович — д. м. н., профессор кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВО «ИГМА» МЗ РФ, Ижевск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-8858-3890

About the authors

Mikhail V. Varganov — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Faculty Surgery, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-8858-3890

Клинико-эпидемиологические особенности течения и лечения мочекаменной болезни среди населения Кабардино-Балкарской республики

Р. М. АРАМИСОВА, Л. Т. ХОКОНОВА, *З. А. КАМБАЧОКОВА,
Л. М. ТАУКЕНОВА, А. Р. ШОГЕНОВА, Д. С. ГОГАЕВА, Э. Х. ДАДАРОВА,
К. Х. ТЕММОЕВА, А. Ж. ХОЛАЕВА, Л. З. ХАЦУКОВА, И. М. ХАГИЕВА

ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Резюме

Мочекаменная болезнь (МКБ) занимает ведущее место в структуре заболеваний органов мочевыделительной системы и характеризуется ростом заболеваемости, сопровождается серьёзными осложнениями, приводящими к инвалидизации и смертности трудоспособного населения. Для комплексного решения проблемы необходимо изучение особенностей эпидемиологии МКБ в каждом регионе для ранней диагностики и своевременного лечения. На основе изучения статистических материалов показаны особенности распространения МКБ в Кабардино-Балкарской республике.

Ключевые слова: уролитиаз; заболеваемость; региональные особенности

Для цитирования: Арамисова Р. М., Хоконова Л. Т., Камбачокова З. А., Таукенова Л. М., Шогенова А. Р., Гогоева Д. С., Дадарова Э. Х., Теммоева К. Х., Холаева А. Ж., Хацукова Л. З., Хагиева И. М. Клинико-эпидемиологические особенности течения и лечения мочекаменной болезни среди населения Кабардино-Балкарской республики. *Антибиотики и химиотерапия*. 2024; 69 (11–12): 80–84. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-80-84>. EDN: FSNHLW.

Clinical and Epidemiological Aspects of The Course of Urolithiasis and Its Treatment Among the Population of the Kabardino-Balkarian Republic

RINA M. ARAMISOVA, LIANA T. KHOKONOVA,
*ZARETA A. KAMBACHOKOVA, LEILA M. TAUKENOVA,
ALINA R. SHOGENOVA, DANA S. GOGAEVA, ELINA KH. DADAROVA,
KAMILA KH. TEMMOEVA, ANZHELINA ZH. KHOLAEVA,
LIANA Z. KHATSUKOVA, IMAN M. KHAGIEVA

Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Abstract

Urolithiasis (UL) occupies a leading place in the structure of urologic diseases and is characterized by an increase in morbidity, accompanied by serious complications leading to disability and mortality among the working-age population. In order to establish a comprehensive solution to the problem, it is necessary to study the aspects of UL epidemiology in each region for early diagnosis and timely treatment. Based on the study of statistical materials, the specifics of UL spread in the Kabardino-Balkarian Republic are shown.

Keywords: urolithiasis; incidence; regional characteristics

For citation: Aramisova R. M., Khokonova L. T., Kambachokova Z. A., Taukenova L. M., Shogenova A. R., Gogaeva D. S., Dadarova E. H., Temmoeva K. H., Kholaeva A. Zh., Khatsukova L. Z., Khagieva I. M. Clinical and epidemiological aspects of the course of urolithiasis and its treatment among the population of the Kabardino-Balkarian Republic. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 80–84. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-80-84>. EDN: FSNHLW. (in Russian)

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: k.zareta.7@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: k.zareta.7@mail.ru



EDN: FSNHLW

Введение

Актуальность проблемы обусловлена высокой распространённостью, тяжестью осложнений и снижением качества жизни у больных мочекаменной болезнью (МКБ) [1, 2]. Лечение и профилактика МКБ являются одной из актуальных проблем урологической практики. По данным эпидемиологических исследований, распространённость МКБ среди населения нашей страны составляет около 10%. Средние показатели распространённости этой патологии варьируют в РФ в зависимости от географической зоны проживания [3].

В течение последних десятилетий отмечается рост числа пациентов с данной патологией. Причём имеется тенденция к снижению среднего возраста пациентов с первичной заболеваемостью МКБ. Если в прошлые десятилетия в лечебные учреждения обращались пациенты в возрасте 44–54 лет, то в последние годы — в возрасте 24–34 лет. Отмечены и гендерные различия в заболеваемости МКБ с более высокими показателями в мужской популяции [4, 5].

Известно, что МКБ относится к многофакторным заболеваниям. Прогрессивно ухудшающиеся природно-экологические условия обитания населения, которые оказывают влияние на организм человека, в совокупности с качеством питания и питьевой воды способствуют подъёму заболеваемости МКБ, тяжести течения и осложнений [6]. В связи с этим, требуется междисциплинарный подход для разработки системы лечебно-профилактических мероприятий по снижению уровня заболеваемости, инвалидизации и смертности.

Наряду с высокой распространённостью уролитиаза выявлены эндемичные регионы, отличающиеся географическим расположением, климатическими условиями, минеральным составом воды и почвы, характером питания [7]. В этой связи важное значение имеет изучение региональных особенностей распространённости МКБ для повышения эффективности урологической помощи населению.

Цель работы — изучение региональных особенностей распространённости, течения и лечения МКБ в Кабардино-Балкарской республике (КБР).

Материал и методы

Материалом для исследования послужили статистические данные о количестве больных с МКБ в 2023 г., представленные ЦОЗМАИТ по КБР (форма № 12 «Сведения о числе заболеваний, зарегистрированных у больных»). Показатели заболеваемости уролитиазом населения КБР за предыдущие два года не были анализированы в связи с тем, что обращаемость больных по всем группам заболеваний была низкой из-за пандемии COVID-19. С целью определения социально-демографического портрета больных МКБ детально были проанализированы истории болезни пациентов, пролеченных стационарно.

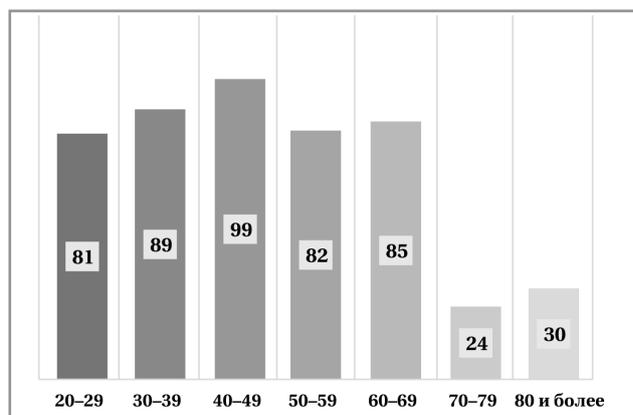


Рис. 1. Возрастная структура больных уролитиазом.
Fig. 1. Age structure of patients with urolithiasis.

Природно-климатические условия в КБР варьируют в зависимости от географической зоны, а их в республике три: равнинная, предгорная и горная. Поэтому был проведён сравнительный анализ распространённости МКБ в зависимости от места проживания по муниципальным районам КБР.

Всего было проанализировано 506 историй болезни, что обеспечивало репрезентативность полученных результатов исследования (по формуле бесповторной выборки). Обработку данных, полученных в результате исследования, выполняли с помощью программы Statistica 6.1. а результаты представляли в абсолютных и относительных значениях. Описательная статистика представлена в виде процентных соотношений.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что в возрастной структуре госпитализированных больных с МКБ колеблется от 20 до 83 лет (рис. 1).

Наибольший удельный вес в стационаре составляют лица в возрасте от 40 до 49 лет, т. е. лица трудоспособного возраста. Обращает внимание и большой удельный вес больных МКБ в возрасте 20–29 лет (17,6%). Среди исследованной популяции пациентов МКБ преобладали мужчины (55,7%).

Отмечена существенная вариабельность частоты МКБ по отдельным муниципальным образованиям. Были выделены муниципальные образования, на территории которых в 2023 г. показатели распространённости МКБ, были наибольшими: Баксанский, Терский и Прохладненский (табл. 1). При сравнении распространённости МКБ по КБР в целом и по муниципальным образованиям с наивысшими показателями с использованием t-критерия выявлено, что в представленных районах эти показатели достоверно ($p < 0,05$) превышают среднереспубликанские (рис. 2).

При сравнении средних показателей МКБ по РФ и КБР выявлено, что различия не являются статистически значимыми для распространённости. Только в одном муниципальном образовании (Терский район) частота заболеваемости МКБ среди взрослого населения (779,1) превышает

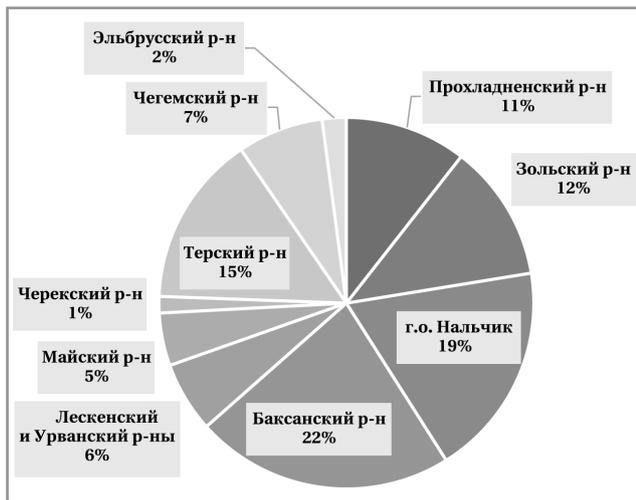


Рис. 2. Распространённость МКБ в муниципальных образованиях КБР
Fig. 2. Prevalence of UL in municipalities of the Kabardino-Balkarian Republic

среднероссийские ($721,8 \pm 32,4$ на 100 тыс. взрослого населения).

При исследовании мочи были выявлены следующие разновидности солевого осадка: ураты (21,4% случаев), оксалаты (8,5%), фосфаты (1%), сочетание солей (7,6%), другие (13,5%).

У больных МКБ с коморбидным состоянием в 20,8% случаев был пиелонефрит. При проведении микробиологического анализа мочи у пациентов основными возбудителями были следующие: *Escherichia coli* — 2,9%, *Enterobacter faecalis* — 1,1% случаев. Во всех других случаях посев мочи был стерильным, что, по-видимому, связано с применением антибактериальной терапии на амбулаторном этапе.

С целью выявления спектра и частоты назначения антибактериальных средств был проведён анализ листов назначений в историях болезни пациентов с МКБ.

С целью изучения спектра и частоты назначения антибактериальных средств был проведён анализ листов назначений в историях болезни пациентов с МКБ.

Как видно из табл. 2, наиболее часто назначались цефалоспорины (47,0%) и фторхинолоны (22,03%), что соответствует клиническим рекомендациям по лечению воспалительных заболеваний мочевыделительных путей. По результатам нашего исследования оперативные методы лечения были применены в 35,8% случаев.

Выводы

1. При сравнении заболеваемости МКБ по РФ и КБР не выявлены статистически значимых различий.

Таблица 1. Заболеваемость МКБ на 100 тыс. населения по районам

Table 1. Incidence of UL per 100 thousand population by districts

Муниципальные районы КБР	Заболеваемость МКБ на 100 тыс. населения
Баксанский	493,0
Зольский	652,7
Майский	340,3
Прохладненский	265,9
Терский	779,1
Урванский	159,6
Чегемский	264,4
Черекский	130,5
Эльбрусский	147,0
г. о. Нальчик	191,5

Таблица 2. Назначение антибактериальных препаратов
Table 2. Prescription of antibacterial medications

Антибактериальная группа	Частота применения в %
Цефалоспорины	47,0
Фторхинолоны	22,03
Макролиды	10,8
Аминогликозиды	4,07
Пенициллины	2,0
Другие	2,5

2. Отмечена существенная вариабельность показателей заболеваемости по отдельным муниципальным образованиям КБР.

3. Определены муниципальные образования, отличающиеся стабильно более высокими показателями распространённости МКБ: Баксанский, Терский и Прохладненский районы.

4. Обнаружены половозрастные особенности заболеваемости МКБ с преобладанием лиц мужского пола в возрасте 39–49 лет, при этом обращает внимание и большой удельный вес больных МКБ молодого возраста от 20 до 29 лет (17,6%).

5. Для снижения уровня заболеваемости в муниципальных образованиях с наиболее высокими показателями необходим комплексный подход, включающий в себя коррекцию территориальных особенностей воздействия окружающей среды (минеральный состав воды и почвы), алиментарных, метаболических факторов, адекватную профилактику уролитиаза.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Внутреннего гранта КБГУ (Договор №11).

Funding. The study was conducted with the financial support of an Internal grant from KBSU (Agreement no. 11).

Литература/References

1. Аляев Ю. Г., Глыбочко П. В., Пушкарь Д. Ю. ред. Урология. Российские клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2021. [Alyayev Yu. G., Glybochko P. V., Pushkar' D. Yu. red. Urologiya. Rossijskie Klinicheskie Rekomendatsii. Moscow: GEOTAR-Media. 2021. (in Russian)]
2. Аполихин О.И., Сивков А.В. и др. Анализ уронефрологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за 2003–2013 г. Экспериментальная и клиническая урология. 2015;2:4–12. [Apolikhin O.I., Sivkov A.V. s soavt. Analiz uronefrologicheskoy zabolevaemosti i smertnosti v Rossijskoj Federatsii za 2003–2013 g. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Urologiya. 2015;2:4–12. (in Russian)]
3. Белай С.И., Довбыш М.А., Белай И.М. Мочекаменная болезнь: актуальность вопроса и перспективы его развития. Вестник ВГМУ. Украина. 2016; 15 (5):19–26. [Belaj S.I., Dovbysh M.A., Belaj I.M. Mochekamennaya bolezn': aktual'nost' voprosa i perspektivy ego razvitiya. Vestnik VGMU. Ukraina. 2016; 15 (5):19–26. (in Russian)]
4. Децик О.З., Мытник З.Н., Соломчак Д.В. Социально-экономические детерминанты заболеваемости и рецидивирования мочекаменной болезни. Проблемы здоровья и экологии. 2015; 4: 80–85. [Detsik O.Z., Mytnik Z.N., Solomchak D.V. Sotsial'no-ekonomicheskie determinanty zabolevaemosti i retsidivirovaniya mochekamennoy boleznii. Problemy Zdorov'ya i Ekologii. 2015; 4: 80–85. (in Russian)]
5. Каприн А.Д., Аполихин О.И., Сивков А.В. с соавт. Заболеваемость мочекаменной болезнью в Российской Федерации с 2005 по 2020 гг. Экспериментальная и клиническая урология. 2022;15 (2): 10–17. [Kaprin A.D., Apolikhin O.I., Sivkov A.V. s soavt. Zabolevaemost' mochekamennoy bolezn' jyu v Rossijskoj Federatsii s 2005 po 2020 gg. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Urologiya. 2022; 15 (2): 10–17. (in Russian)]
6. Мартов А. Г. и др. Клинические рекомендации-мочекаменная болезнь 2019. М.: Российское общество урологов. 2019. [Martov A. G. i dr. Klinicheskie rekomendatsii-mochekamennaya bolezn' 2019. Moscow: Rossijskoe Obshchestvo Urologov. 2019. (in Russian)]
7. Крючков И.А., Чехонацкая М.Л., Россоловский А.Н. и др. Мочекаменная болезнь: этиология и диагностика (Обзор литературы). Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2017; 6 (2): 517–522. [Kryuchkov I.A., Chekhonatskaya M.L., Rossolovskij A.N. i dr. Mochekamennaya bolezn': etiologiya i diagnostika (Obzor literatury). Bjulleten' Meditsinskikh Internet-Konferentsij. 2017; 6 (2): 517–522. (in Russian)]

Поступила / Received 20.11.2024

Принята в печать / Accepted 02.12.2024

Информация об авторах

Арамисова Рина Мухамедовна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой госпитальной терапии Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик, Россия

Хоконова Лиана Тимофеевна — к. м. н., ассистент кафедры госпитальной терапии Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик, Россия

Камбачокова Зарета Анатольевна — д. м. н., профессор кафедры госпитальной терапии Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Таукенова Лейла Магомедовна — к. м. н., доцент кафедры неврологии, психиатрии, наркологии Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Шогенова Алина Руслановна — доцент, руководитель центра терапевтической стоматологии института стоматологии и ЧЛХ ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Гогаева Дана Сергеевна — студентка 5 курса специальности «Лечебное дело» Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Дадарова Элина Хасановна — ассистент кафедры нормальной и патологической анатомии человека Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Теммоева Камила Хасановна — студентка 6 курса специальности «Лечебное дело» Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Холаева Анжелика Жанхотовна — студентка 6 курса специальности «Лечебное дело» Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Хацуква Лиана Замировна — студентка 6 курса специальности «Лечебное дело» Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

About the authors

Rina M. Aramisova — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Hospital Therapy, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Liana T. Khokonova — Ph. D. in Medicine, Assistant at the Department of Hospital Therapy, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Zareta A. Kambachokova — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Hospital Therapy, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Leila M. Taukenova — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Neurology, Psychiatry, and Narcology, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Alina R. Shogenova — Associate Professor, Head of the Centre for Therapeutic Dentistry of the Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Dana S. Gogaeva — 5th-year student with a General Medicine major, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Elina Kh. Dadarova — Assistant of the Department of Normal and Pathological Human Anatomy, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Kamila Kh. Temmoeva — 6th-year student with a General Medicine major, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Anzhelina Zh. Kholaeva — 6th-year student with a General Medicine major, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Liana Z. Khatsukova — 6th-year student with a General Medicine major, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Хагиева Иман Мусалиповна — студентка 6 курса специальности «Лечебное дело» Медицинской академии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Iman M. Khagieva — 6th-year student with a General Medicine major, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Биоплёнки и методы их воспроизведения в эксперименте

А. Д. ДАУДОВА, Ю. З. ДЕМИНА, О. В. РУБАЛЬСКИЙ, *А. Л. ЯСЕНЯВСКАЯ

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

Резюме

С момента выделения чистой культуры возбудителя Р. Кохом и формулировки им постулатов, отражающих роль микроорганизма в развитии инфекционных заболеваний, основным объектом исследования являлись и до настоящего времени остаются в большинстве случаев изолированные бактерии, их морфологические, биохимические, генетические свойства. В отношении планктонных, свободных клеток изучаются также фармакокинетические и фармакодинамические свойства соединений с потенциальной антибактериальной активностью. В последние годы по мере накопления знаний и обнаружения новых инфекций и состояний, в которых участвуют особым образом организованные сообщества микробов — биоплёнки, меняется подход к диагностике и терапии инфекционных заболеваний, особенно с хроническим течением. В связи с этим совершенствование, разработка новых репрезентативных моделей микробных консорциумов как *in vitro*, так и *in vivo* чрезвычайно актуальны. Вкупе с современными методами исследования это позволит углубить познания в области закономерностей формирования, построения, функционирования микробного мира в определённой экологической нише, отработать инновационные подходы к терапии биоплёночных инфекций, обнаружить новые таргетные точки воздействия antimicrobных препаратов в отношении не отдельных бактерий, а многогранного микробного консорциума. В обзоре представлены основные подходы к воспроизведению биоплёночных инфекций в эксперименте в условиях *in vitro* и *in vivo*, их преимущества, недостатки и возможные перспективы повышения релевантности и валидности моделей.

Ключевые слова: биоплёнка; бактерии; методы исследования биоплёнки

Для цитирования: Даудова А. Д., Демина Ю. З., Рубальский О. В., Ясенявская А. Л. Биоплёнки и методы их воспроизведения в эксперименте. *Антибиотики и химиотерапия*. 2024; 69 (11–12): 85–92. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-85-92>. EDN: SRKNBR.

Biofilms and Methods of Their Reproduction in the Experiment

ADILYA D. DAUDOVA, YULIYA Z. DEMINA, OLEG V. RUBALSKY, *ANNA L. YASENYAVSKAYA

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

Abstract

Isolated bacteria, their morphological, biochemical, and genetic properties are, to this day, the main object of research since the isolation of a pure culture of the pathogen by R. Koch and his formulation of the postulates reflecting the role of the microorganism in the development of infectious diseases. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of compounds with potential antibacterial activity are also studied in relation to planktonic, free cells. In recent years, as knowledge accumulates and new infections and conditions involving specially organized microbial communities — biofilms — are discovered, the approach to the diagnosis and treatment of infectious diseases, especially those with a chronic course, is changing. In this regard, the improvement and development of new representative models of microbial consortia both *in vitro* and *in vivo* are extremely relevant. Along with modern research methods, this will allow us to deepen our knowledge of the patterns of formation, construction, and functioning of the microbial world in a specific ecological niche, to develop innovative approaches to the treatment of biofilm infections, and to discover new target points for the action of antimicrobial drugs, directed at a multifaceted microbial consortium instead of individual bacteria. The review presents the main approaches to reproducing biofilm infections *in vitro* and *in vivo* experiments, highlighting their advantages, disadvantages, and possible prospects for increasing the relevance and validity of the models.

Keywords: biofilms, bacteria, biofilm research methods

For citation: Daudova A. D., Demina Yu. Z., Rubalsky O. V., Yasyenyavskaya A. L. Biofilms and methods of their reproduction in the experiment. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 85–92. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-85-92>. EDN: SRKNBR. (in Russian)

Одной из основных задач медицинской микробиологии является выделение и идентификация этиологического агента, поиск эффектив-

ных методов его элиминации из макроорганизма и профилактика дальнейшего распространения.

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: yasen_9@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: yasen_9@mail.ru

EDN: SRKNBR



В 1881 г. Робертом Кохом была опубликована статья «Методы изучения патогенных организмов», в которой автором был описан метод выделения чистой культуры возбудителя, основанный на механическом разобщении бактериальных клеток [1]. Таким образом в истории микробиологии было положено начало «периода чистой культуры». Изучение этиологии инфекционных заболеваний вплоть до настоящего времени осуществляется на основе определения чистых культур микроорганизмов, выделенных из патологического очага, и составляет основу бактериологического метода исследования.

Однако рост отдельных планктонных бактерий в среде, богатой питательными веществами, существенно отличается от их существования в естественных условиях, в том числе в организме человека. Обычно планктонный фенотип бактерий встречается транзиторно и в минимальном количестве, как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой. Бактериальные популяции в организме больного представляют собой преимущественно биоплёнки — полимикробные фиксированные сообщества, внедрённые в синтезированный ими полимерный матрикс [2, 3].

Посредством современных молекулярных, геномных, транскриптомных и протеомных методов исследования удалось показать, что при выделении чистой культуры определяется лишь около 1% клеток патогенного микробиоценоза. В результате лечение нацелено лишь на 1–2 вида бактерий из множества штаммов, присутствующих в составе биоплёнки [4, 5]. Наличие жизнеспособных, но некультивируемых микробов приводит в ряде случаев к ошибочному или неполному диагнозу. Не исключено заключение о «стерильном воспалении» или вирусной инфекции.

Биоплёнки — это основной фенотип большинства бактерий в естественных условиях обитания как во внешней среде, так и в организме человека. При этом сами бактерии составляют лишь 5–35% массы биоплёнки, остальная часть — межбактериальный неоднородный в химическом отношении матрикс.

Экстрацеллюлярный слой содержит до 40–95% полисахаридов. Концентрация других химических компонентов сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов до 40% и нуклеиновых кислот 1–20%. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, так как 80–90% объёма биоплёнки занимает вода. Бактериальный матрикс обладает собственной системой микроциркуляции, которая позволяет поступать вглубь биоплёнки и циркулировать в ней питательным веществам, кислороду, углекислому газу, ферментам, сигнальным метаболитам, а также ответственна за выведение продуктов ме-

таболизма бактериальных клеток. Снаружи матрикс биоплёнки покрывает поверхностная оболочка, основным элементом которой является трёхслойная мембрана. Поверхностная оболочка выполняют барьерную функцию, защищает микробные сообщества от действия окружающей среды, а также придаёт биоплёнке прочность.

Сообщество биоплёнок может быть сформировано из одного вида микроорганизмов или включать комплекс различных видов бактерий, грибов, водорослей и т. д. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина. Микрофлора биоплёнки более устойчива к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы по сравнению со свободно плавающими бактериями. Сессильные микробы приобретают устойчивость к воздействию ультрафиолетового излучения, дегидратации, вирусам, антибиотикам и факторам резистентности макроорганизма [6, 7]. Ингибирующая концентрация антибиотиков для бактерий, входящих в состав биоплёнок, в 100–1000 раз выше в сравнении с планктонными клетками [8–10].

Известны следующие механизмы защиты микроорганизмов в условиях биоплёнки:

— блокировка, которую осуществляет полисахаридный матрикс, синтезированный микроорганизмами микробного сообщества, препятствуя проникновению эндогенных и экзогенных факторов защиты;

— взаимная защита, которая обеспечивается самими микроорганизмами, входящими в состав биоплёнки, когда они обеспечивают собственными защитными механизмами всех «жителей микробного города»: защитные ферменты, антибиотик-связывающие белки, обмен плазмидами;

— «бездействие» или снижение метаболической активности. Данная стратегия выживания обусловлена тем, что большинство антибактериальных механизмов направлено на активные процессы метаболизма микробов.

Многочисленные физиологические процессы, происходящие в биоплёнке, отличаются от физиологии чистых культур этих же бактерий. Реакция микроорганизмов на изменение условий окружающей среды в биоплёнке существенно отличается от реакции каждого отдельного вида в монокультуре. Такая организация обеспечивает её физиологическую и функциональную стабильность и является основой конкурентного выживания в экологической нише [11].

Термин «биоплёнка» в отношении фиксированных микробных сообществ был введён в 1981 г., но бактериальная агрегация наблюдалась и считалась важной для функционирования консор-

циумов гораздо ранее [12, 13]. Так, наблюдения, связывающие этиологию персистирующей (хронической) инфекции с агрегацией бактерий, были зарегистрированы в 1970 годах в лёгких пациентов, страдающих от муковисцидоза (МВ). Агрегированные бактерии наблюдались в мокроте пациентов с МВ, хронически инфицированных мукоидными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* [14, 15].

В 1995 г. биоплёнки были определены J. W. Costerton и соавт. [16] как «структурированное сообщество клеток бактерий, заключённых в полимерную матрицу собственного производства, прикреплённую к поверхности».

По мере накопления знаний и обнаружения новых инфекций и состояний, в которых участвуют особым образом организованные скопления микробов представление о биоплёнке меняется. Например, было обнаружено, что патогенные агрегаты биоплёнки могут образовываться без прикрепления к поверхности и что матрица биоплёнки не обязательно должна быть выработана бактериями самой биоплёнки [17]. На формирование структуры влияют доступность питательных веществ, кислорода и другие условия окружающей среды. Архитектоника 3D-микроролоний биоплёнок находится в зависимости от источника углерода [18].

Недавние геномные и протеомные исследования идентифицировали многие гены и генные продукты, дифференциально экспрессирующиеся во время формирования биоплёнок, раскрывая сложность развития этого процесса [19]. Предполагается, что переключение режима мобильности бактериальных клеток от планктонных до sessильных является сложным и строго регулируемым процессом, определяемым генетическим кодом. Рассеивание клеток и небольших микробных агрегатов на последней стадии развития биоплёнки также, по мнению ряда авторов, считается генетически запрограммированным процессом [19, 20].

По результатам ряда исследований было обнаружено, что общей схемы экспрессии генов для биоплёнок планктонного и sessильного типов пока не выявлено. Различные гены регулируются в сторону активации или репрессии в количестве, варьирующем от 1 до 38% от общего генома. Подобная вариабельность результатов может быть связана с различиями в видовом составе биоплёнок, в экспериментальных сценариях, а также с тем, что микрочипы ДНК, обладая высокой чувствительностью, обеспечивают считывание информации только в определённый временной промежуток [21–24].

Наличие последовательностей бактериального генома вместе с разработкой микрочипов, детектирующих экспрессию генов микроорганизмов, позволяет не только произвести сравнитель-

ный анализ преобразования наследственной информации в функциональные продукты у бактерий, выращенных в различных условиях, но и определить в дальнейшем терапевтические мишени для борьбы с биоплёнками.

Несмотря на то, что первые публикации об агрегации бактерий были результатом наблюдения *in vivo*, более поздние знания о процессах развития медицинских биоплёнок в значительной степени были получены благодаря использованию систем поверхностного роста *in vitro*.

Методологический подход к изучению биоплёнок *in vitro* подразумевает 2 основных направления: статический и динамический, имитирующий создание условий, приближённых к естественным.

Культивирование биоплёнок в статических условиях подразумевает использование 96-луночных микротитровальных планшетов в различных модификациях. После инокуляции в лунки бактериальной суспензии и культивирования в благоприятных условиях производят удаление планктонных бактерий и индикацию биоплёнки различными способами. К преимуществам данной методики следует отнести доступность и простоту воспроизведения, наглядность и высокую производительность. Однако в настоящее время отсутствуют единые стандарты применения этого метода в различных лабораториях. Адгезивная способность микробов, инициирующая начальные этапы формирования биоплёнок, зависит не только от структурно-морфологических особенностей организмов, но и от физико-химических свойств биотических и абиотических экспериментальных поверхностей, а также состава, осмолярности питательных сред и степени аэрации [25].

ALI-метод (air-liquid interface) подразумевает культивирование биоплёнок в планшетах, расположенных под углом 30–50°. Детекция биоплёнок производится без использования красителей, с применением фазово-контрастной микроскопии, в режиме реального времени. К недостаткам следует отнести необходимость постоянного контроля уровня питательной среды либо продолжительности культивирования для избежания высыхания зоны соприкосновения биоплёнки с поверхностью лунки [25].

Метод гидроксипатитных поликарбанатных дисков является разновидностью статического метода. Диски с поверхностно нанесённой бактериальной суспензией помещаются на поверхность плотной питательной среды. Через поры дисков питательные вещества поступают к микробам. Метод рекомендован авторами для изучения антимикробной активности препаратов [26].

J. H. Merritt и соавт. [26] предложили использовать 6-луночные планшеты, с индивидуальной подачей и отводом питательной среды из каждой лунки. Метод занимает промежуточное положение

между статическими и динамическими методами культивирования биоплёнок.

Более комплексные исследования роста биоплёнки возможны с использованием динамических систем (ферментёры, аппарат Робинсона), когда планктонная форма микроба помещается в жидкую питательную среду, циркулирующую в закрытой системе.

При проточном (микроциркуляторном) методе биоплёнка микроорганизмов образуется на поверхности силиконовых трубок проточных ячеек (flow cells), через которые с помощью помпы постоянно подаётся питательная среда. Метод ценен при воспроизведении процесса биоплёнообразования на абиотических поверхностях, например, на внутрисосудистых катетерах [27].

Реакторы с капельным потоком предназначены для исследования биоплёнок, выращенных в условиях низкого сдвига. Реактор с капельным потоком состоит из четырёх параллельных тестовых каналов, каждый из которых способен вместить один образец стандартного размера для предметного стёкла микроскопа. Реактор с капельным потоком подходит для общих исследований биоплёнок, криосекции образцов биоплёнок, высокой выработки биомассы, оценки медицинских материалов и постоянного тестирования медицинских устройств [28]. Использование данного технологического процесса оптимально для изучения как одиночных, так и многовидовых биоплёнок с капельным течением и предлагает платформу для фундаментальных исследований образования биоплёнок, взаимодействия микроб-микроб и коррозии под воздействием микроорганизмов. Визуализации достигается за счёт применения лазерной десорбционно-ионизационной масс-спектрометрии, масс-спектрометрии вторичных ионов и сканирующей электронной микроскопии [29].

Реактор с вращающимся диском состоит из тефлонового диска с углублениями для съёмных ёмкостей (ячеек). В нижней части вращающегося диска находится стержневой магнит, позволяющий вращению диска создавать сдвиг поверхности жидкости. Весь диск, содержащий 18 образцов, помещают в стеклянный реактор объёмом 1000 мл. Жидкая питательная среда циркулирует по сосуду, в то время как диск вращается магнитной мешалкой. Ёмкости (ячейки) извлекаются из корпуса реактора, биоплёнки соскабливаются для дальнейшего изучения или получения изображения под микроскопом. Вращающиеся дисковые реакторы предназначены для лабораторных оценок эффективности биоцидов, удаления биоплёнок и характеристик противообрастающих материалов [30].

Размеры биоплёнки *in vitro* варьируют от приблизительно 1 см² в статическом анализе микротитровальных планшетов до 10 см² в проточных

ячейках. Толщина бактериальных биоплёнок, прикреплённых к стабильной поверхности, может достигать 300 мкм. Во всех случаях верхний слой биоплёнки подвергается либо воздействию атмосферного воздуха, либо непрерывной подаче жидкой среды, что значительно отличается от условий в организме-хозяине.

В динамических системах осуществляется постоянное поступление питательных веществ и удаление продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, что интенсифицирует процесс биоплёнообразования. Важно отметить, что условия формирования биоплёнки в этом случае стандартизованы. Однако сложная конструкция оборудования, большие объёмы питательных сред, высокие экономические затраты по его обслуживанию, затруднение стерилизации внутренних поверхностей аппаратов, низкая производительность ограничивают их использование. Несмотря на создание в динамических системах условий, максимально приближенных к естественным условиям обитания микробов, они не способны в полной мере отражать влияние факторов внешней среды и особенности взаимодействия с макроорганизмом [25, 31].

Хотя все вышеперечисленные системы *in vitro* могут использоваться для тестирования эффектов простых параметров на структуру и рост биоплёнки, они не способны имитировать сложность среды хозяина.

Причиной острых бактериальных инфекций обычно являются планктонные бактерии и, как правило, они успешно поддаются лечению антибиотиками и другими антибактериальными препаратами. Однако известно, что более 70% инфекционных заболеваний человека сопровождаются образованием биоплёнок [32]. В этих случаях формирование персистеров в микробных сообществах приводит к хронизации процесса, развитию лекарственной устойчивости, возможным неблагоприятным исходам заболеваний.

Очевидно, что большинство текущих гипотез о закономерностях образования, архитектоники и распространения биоплёнок, формирования устойчивости к антибиотикам в значительной мере базируются на наблюдениях за *in vitro*-биоплёнками. Экстраполировать полученные сведения в абсолюте на значительно более сложную устроенную среду *host*-организма, с которой сталкиваются патогенные бактерии при хронических биоплёночных инфекциях с их генотипическими и фенотипическими изменениями не представляется возможным. Важная связь между *in vitro* и инфекционными биоплёнками может быть установлена на основе соответствия между наблюдениями за биоплёнкой «на стекле» и в репрезентативных животных моделях, где при сохранении динамического взаимодействия с макроорганиз-

мом возможна комплексная оценка значительно большего числа параметров [17].

Для изучения свойств биоплёнок и микробов, их образующих, создано немало моделей на животных. Удалось имитировать такие заболевания, как кариес, эндокардит, пневмония, кератит, средний отит [33], муковисцидоз [34–36], хронические раневые инфекции [37] и инфекции, связанные с имплантатами [38, 39].

Основным преимуществом использования моделей на животных для изучения медицинских биоплёнок является наличие макросреды среды организма-хозяина, включая наличие компонентов защитных сил организма и других сложных биологических систем, которые невозможно воспроизвести в условиях *in vitro*.

Для воспроизведения биоплёнки *in vivo* используют различных животных — от коз и шиншиллы до крыс и мышей. Ряд исследователей отдают предпочтение крупным животным, полагая, что их физиологические параметры могут быть приближены к таковым у организма человека. Грызуны, особенно мыши, являются наиболее востребованными видами в моделях инфекций, учитывая относительно низкую стоимость приобретения и содержания этих животных, вариативность экспериментальных доступов и воспроизводимость моделей. Следует отметить, что, по мнению некоторых учёных, у разных инбредных штаммов мышей течение одной и той же инфекции, как и иммунологический ответ на один и тот же инфекционный агент также могут отличаться [40–42].

При выборе инфекционного агента учитывается его релевантность для исследуемой биоплёночной инфекции. Так, например, *Pseudomonas aeruginosa* используется для создания модели хронической лёгочной инфекции или раневой инфекции, *Staphylococcus aureus* — в моделях ортопедической аллопластической инфекции. Модель должна быть воспроизводимой, а формирующаяся биоплёнка должна быть доступна для идентификации. Многие модели животных включают либо структурное повреждение, такое как создание раны на коже животного для хронических моделей ран, либо имплантацию инородного тела как в ортопедических аллопластических моделях [43, 44].

Так, например, модель хронической инфекции лёгких воспроизводили на самках мышей BALB/c. Гранулы альгината морских водорослей с внедрённым в них *P. aeruginosa* PAO579 помещали в левое лёгкое мышей BALB/c с помощью иглы с шариком на конце посредством трахеотомии. Гомогенат лёгких по итогам эксперимента подвергали количественным бактериологическим методам исследования [45].

Для модели хронической раневой инфекции в качестве экспериментальных животных исполь-

зовали самок мышей C3H/HeN или BALB/c. Животных подвергали термическому воздействию до возникновения ожога третьей степени. Подкожно вводили раствор, содержащий *P. aeruginosa* PAO1. Мазки из-под струпов брались сразу после умерщвления мышей и высеивались на модифицированную среду Конради–Дригальского, селективную для грамотрицательных палочек [46].

Модель хронического остеомиелита была инициирована на инбредных мышках C57BL/6 посредством транстибиальной имплантации булавки из нержавеющей стали, несущей на своей поверхности различные штаммы *S. aureus* (M2 и USA300 LAC) [47].

Несмотря на стремление учёных воспроизвести в организме экспериментальных животных, условий, имитирующих хроническую инфекцию, это не всегда оказывается возможным. Причиной, в частности, является необходимая долгосрочность исследования. Так, например, в лёгких человека противостояние микроба и организма-хозяина при муковисцидозе может длиться до 30 лет и приводить к возникновению новых фенотипических и генотипических вариантов инфицирующих бактерий [48]. Разработанные на сегодняшний день модели, включающие инокуляцию бактерий, внедрённых либо в агар, полученный из морских водорослей, агарозу или в нативный альгинат, имеют ограниченный срок жизни от 1 до 3 нед. [34]. В процессе эксперимента животные либо погибают, либо становятся устойчивыми к манипуляциям [34, 35, 40, 49].

Технологический прогресс способствует более активному применению в различных областях медицины девайсов, внедряемых в организм человека. Это значительно облегчает жизнь пациентов, однако одновременно способствует росту числа имплантат-ассоциированных инфекций. Порядка 60–70% всех внутрибольничных инфекций связаны с использованием медицинских имплантатов различного профиля, что делает разработку соответствующих моделей чрезвычайно актуальной. Перспективно внедрение в макроорганизм предварительно колонизированных имплантатов. Одним из их преимуществ является контроль инокулята на имплантате до вставки [47, 50].

Особенности *in vivo* бактерий в биоплёнках, имитирующих хронические инфекции, включают длительное воздействие факторов неспецифической и специфической резистентности хозяина. Бактерии должны не только противостоять бактерицидной активности иммунного ответа, но и адаптировать свой метаболизм к изменениям микросреды, возникающим в результате активности хозяина и особенностей диффузии питательных веществ в агрегационном образовании. Эти факторы влияют на рост микроорганизмов

и могут ограничить размер биоплёнки во время экспериментальной инфекции.

Исследования показали, что биоплёнки, формируемые в условиях *in vivo*, часто многочисленны и малы. Авторы отмечают, что в животных моделях чаще определяются недифференцированные биоплёночные образования, напоминающие небольшие агрегаты в водной среде [51]. Биоплёнки *in vivo* меньше по физическим размерам по сравнению с биоплёнками *in vitro*, у них нет грибовидных структур, они встроены в материал хозяина и постоянно подвергаются защитным реакциям хозяина [17]. Исключением являются модели, имитирующие катетер/шунт-опосредованные инфекции с использованием полых трубок, где наблюдается гораздо большее накопление биоплёнки [38].

На примере *S. aureus* было продемонстрировано, что бактерии используют разные стратегии для развития биоплёнок *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* биоплёнки стафилококка в основном состоят из «самопроизводящегося» внеклеточного матрикса (ЕСМ) полисахаридной природы. В условиях же *in vivo* золотистый стафилококк образует белковые биоплёнки, используя факторы хозяина, экспрессия генов, ассоциированных с ЕСМ, при этом изменяется. Различные пути развития приводят к формированию различных по составу биоплёнок, что необходимо учитывать при планировании эксперимента и оценке результатов исследований [52].

Заключение

В эпоху глобальной угрозы формирования поли- и панрезистентности микробов к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам, роста

внутрибольничных инфекций, связанных зачастую с внедрением в организм пациента имплантируемых изделий, моделирование в условиях *in vitro* и *in vivo* инфекций, вызванных микробными сообществами, безусловно, является востребованным и чрезвычайно актуальным. Перспективны оптимизация имеющихся методов *in vitro* с максимальным приближением к условиям существования в живом организме, а также разработка моделей хронической инфекции с возможностью наблюдения в течение длительного промежутка времени (в течение недель, месяцев, лет) по аналогии с хронической инфекцией человека. Учитывая, что лечение хронических инфекций — это воздействие на микробное сообщество в целом, необходимо понимание механизмов формирования, структурирования, закономерностей функционирования биоплёнки, которое в настоящее время требует реализации современных методов геномики, транскриптомики и протеомики. Необходимы новые подходы к диагностике и лечению хронических инфекций: определение новых целевых точек действия химиотерапевтических препаратов, тестирование их антимикробной активности не на отдельных штаммах микробов, а на воспроизведённой модели микробного консорциума в определённой эконше.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации в части проведения НИР по теме «Разработка композиций для персонализированной антибактериальной терапии на основе вирулентных стафилококковых бактериофагов с контролируемой литической активностью».

Литература/References

1. Голиков А. А. Роберт Кох. Сердечный приступ. doi://proza.ru/2015/03/24/2325 [Golikov A. A. «Robert Koh. Serdechnyj pristup». doi://proza.ru/2015/03/24/2325 (in Russian)]
2. Costerton J. W., Geesey G. G., Cheng K.-J. How bacteria stick. *Scientific American*. 1978; 238 (1): 86–95. doi:10.1038/scientificamerican0178-86.
3. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995; 49: 711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
4. Ehrlich G. D., Hu F. Z., Shen K., Stoodley P., Post J. C. Bacterial plurality as a general mechanism driving persistence in chronic infections. *Clin Orthop Relat Res*. 2005; 437: 20–24. doi: 10.1097/00003086-200508000-00005.
5. Dowd S. E., Sun Y., Secor P. R., Rhoads D. D., Wolcott B. M., James G. A., Wolcott R. D. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol*. 2008; 8: 43. doi: 10.1186/1471-2180-8-43.
6. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000; 182 (10): 2675–2679. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.
7. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318–1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
8. El-Azizi M., Mushtaq A., Drake C., Lawhorn J., Barenfanger J., Verhulst S., Khardori N. Evaluating antibiograms to monitor drug resistance. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11 (8): 1301–1302. doi: 10.3201/eid1108.050135.
9. Irie Y., Borlee B. R., O'Connor J. R., Hill P. J., Harwood C. S., Wozniak D. J., Parsek M. R. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109 (50): 20632–6. doi: 10.1073/pnas.1217993109. Epub 2012 Nov 21. PMID: 23175784; PMCID: PMC3528562.
10. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*. 2013; 136: 1–51. doi: 10.1111/apm.12099. PMID: 23635385.
11. Мальцев С. В., Мансурова Г. Ш. Что такое биоплёнка? Практическая медицина. 2011; 53: 7–10 [Mal'cev S. V., Mansurova G. Sh. Chto takoe bioplenka? Prakticheskaya medicina. 2011; 53: 7–10 (in Russian)]
12. McCoy W. E., Bryers J. D., Robbins J., Costerton J. W. Observations of fouling biofilm formation. *Can J Microbiol*. 1981. Vol. 27, no. 9. P. 910–917. doi: 10.1139/m81-143. PMID: 7306879.
13. Teske A., Stahl D. A. Microbial mats and biofilms: Evolution, structure and function of fixed microbial communities, in biodiversity of microbial life: foundation of earth's biosphere. J. T. Staley (ed.). New York: Wiley-Liss. 2002; 49–100.
14. Hoiby N., Flensburg E. W., Beck B., Friis B., Jacobsen S. V., Jacobsen L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Scand J Respir Dis*. 1977; 58 (2): 65–79.
15. Lam J., Chan R., Lam K., Costerton J. W. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun*. 1980; 28 (2): 546–556. doi: 10.1128/iai.28.2.546-556.1980. PMID: 6772562; PMCID: PMC550970.

16. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
17. Bjarnsholt T., Alhede M., Alhede M., Eickhardt-Sørensen S. R., Moser C., Kihl M., Jensen P. Ø., Høiby N. The *in vivo* biofilm. *Trends Microbiol.* 2013; 21 (9): 466–474. doi: 10.1016/j.tim.2013.06.002.
18. Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jørgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol.* 2003; 48 (6): 1511–1524. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03525x. PMID: 12791135.
19. Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 2003; 4 (6): 219. doi: 10.1186/gb-2003-4-6-219. Epub 2003 May 27. PMID: 12801407; PMCID: PMC193612.
20. O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 49–79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49. PMID: 11018124.
21. Schembri M. A., Kjaergaard K., Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol.* 2003; 48 (1): 253–267. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03432.x. PMID: 12657059.
22. Whiteley M., Banger M. G., Bumgarner R. E., Parsek M. R., Teitzel G. M., Lory S., Greenberg E. P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature.* 2001; 413 (6858): 860–864. doi: 10.1038/35101627. PMID: 11677611.
23. Stanley N. R., Britton R. A., Grossman A. D., Lazazzera B. A. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol.* 2003; 185 (6): 1951–1957. doi: 10.1128/JB.185.6.1951-1957.2003.
24. Wen Z. T., Burne R. A. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68 (3): 1196–1203. doi: 10.1128/AEM.68.3.1196-1203.2002.
25. Лямин А. В., Боткин Е. А., Жестков А. В. Методы выявления биоплёнок в медицине: возможности и перспективы. *КМАХ.* 2012; 14 (1): 17–22. [Lyamin A. V., Botkin E. A., Zhestkov A. V. Metody vyjavlenija bioplenok v medicine: vozmozhnosti i perspektivy. *KMAH.* 2012. 14 (1): 17–22. (in Russian)]
26. Merritt J. H., Kadouri D. E., O'Toole G. A. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol.* 2005. Chapter 1: Unit 1B.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.
27. Jakobsen T. H., van Gennip M., Christensen L. D., Bjarnsholt T., Givskov M. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition *in vitro*. *Methods Mol Biol.* 2011; 692: 253–263. doi: 10.1007/978-1-60761-971-0_18.
28. Schwartz K., Stephenson R., Hernandez M., Jambang N., Boles B. R. The use of drip flow and rotating disk reactors for *Staphylococcus aureus* biofilm analysis. *J Vis Exp.* 2010; 27 (46): 2470. doi: 10.3791/2470.
29. Li B., Dunham S. J. B., Ellis J. F., Lange J. D., Smith J. R., Yang N., King T. L., Amaya K. R., Arnett C. M., Swedler J. V. A versatile strategy for characterization and imaging of drip flow microbial biofilms. *Anal Chem.* 2018; 90 (11): 6725–6734. doi: 10.1021/acs.analchem.8b00560.
30. Schwartz K., Stephenson R., Hernandez M., Jambang N., Boles B. R. The use of drip flow and rotating disk reactors for *Staphylococcus aureus* biofilm analysis. *J Vis Exp.* 2010; 27 (46): 2470. doi: 10.3791/2470.
31. Марданова А. М., Кабанов Д. А., Рудакова Н. Л., Шарипова М. Р. Биоплёнки: основные принципы организации и методы исследования. Казань: Линк. 2016; 42. [Mardanova A. M., Kabanov D. A., Rudakova N. L., Sharipova M. R. Bioplenki: osnovnye principy organizacii i metody issledovaniya. Kazan': Link. 2016; 42. (in Russian)]
32. Тец В. В., Тец Г. В. Микробные биоплёнки и проблемы антибиотикотерапии. *Практическая пульмонология.* 2013; 4: 60–64. [Tec V. V., Tec G. V. Mikrobnye bioplenki i problemy antibiotikoterapii. *Prakticheskaja Pul'monologija.* 2013; 4: 60–64. (in Russian)]
33. Ehrlich G. D., Veeh R., Wang X., Costerton J. W., Hayes J. D., Hu F. Z., Daigle B. J., Ehrlich M. D., Post J. C. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA.* 2002; 287 (13): 1710–1715. doi: 10.1001/jama.287.13.1710.
34. Pedersen S. S., Shand G. H., Hansen B. L., Hansen G. N. Induction of experimental chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection with *P. aeruginosa* entrapped in alginate microspheres. *APMIS.* 1990; 98 (3): 203–211.
35. Hoffmann N., Rasmussen T. B., Jensen P. Ø., Stub C., Hentzer M., Molin S., Ciofu O., Givskov M., Johansen H. K., Høiby N. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infect Immun.* 2005; 73 (4): 2504–2514. doi: 10.1128/IAI.73.4.2504-2514.2005.
36. Moser C., Van Gennip M., Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Lee B., Hougen H. P., Calum H., Ciofu O., Givskov M., Molin S., Høiby N. Novel experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection model mimicking long-term host-pathogen interactions in cystic fibrosis. *APMIS.* 2009; 117 (2): 95–107. doi: 10.1111/j.1600-0463.2008.00018.x.
37. Schaber J. A., Triffo W. J., Suh S. J., Oliver J. W., Hastert M. C., Griswold J. A., Auer M., Hamood A. N., Rumbaugh K. P. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infect Immun.* 2007; 75 (8): 3715–3721. doi: 10.1128/IAI.00586-07.
38. van Gennip M., Christensen L. D., Alhede M., Quortrup K., Jensen P. Ø., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. Interactions between polymorphonuclear leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on silicone implants *in vivo*. *Infect Immun.* 2012; 80 (8): 2601–2607. doi: 10.1128/IAI.06215-11. Epub 2012 May 14. PMID: 22585963; PMCID: PMC3434577.
39. Christensen L. D., Moser C., Jensen P. Ø., Rasmussen T. B., Christophersen L., Kjelleberg S., Kumar N., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an *in vivo* intraperitoneal foreign-body infection model. *Microbiology (Reading).* 2007; 153 (7): 2312–2320. doi: 10.1099/mic.0.2007/006122-0. PMID: 17600075.
40. Moser C., Jensen P. Ø., Kobayashi O., Hougen H. P., Song Z., Rygaard J., Kharazmi A. H. Improved outcome of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is associated with induction of a Th1-dominated cytokine response. *Clin Exp Immunol.* 2002; 127 (2): 206–213. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01731.x.
41. Moser C., Hougen H. P., Song Z., Rygaard J., Kharazmi A., Høiby N. Early immune response in susceptible and resistant mice strains with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection determines the type of T-helper cell response. *APMIS.* 1999; 107 (12): 1093–1100. doi: 10.1111/j.1699-0463.1999.tb01514.x. PMID: 10660139.
42. Prabhakara R., Harro J. M., Leid J. G., Keegan A. D., Prior M. L., Shirliff M. E. Suppression of the inflammatory immune response prevents the development of chronic biofilm infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2011; 79 (12): 5010–5018. doi: 10.1128/IAI.05571-11.
43. Trøstrup H., Thomsen K., Christophersen L. J., Hougen H. P., Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Kirkby N., Calum H., Høiby N., Moser C. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm aggravates skin inflammatory response in BALB/c mice in a novel chronic wound model. *Wound Repair Regen.* 2013; 21 (2): 292–299. doi: 10.1111/wrr.12016.
44. Brady R. A., Leid J. G., Calhoun J. H., Costerton J. W., Shirliff M. E. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 52 (1): 13–22. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x.
45. Pedersen S. S., Shand G. H., Hansen B. L., Hansen G. N. Induction of experimental chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection with *P. aeruginosa* entrapped in alginate microspheres. *APMIS.* 1990; 98 (3): 203–211.
46. Calum H., Moser C., Jensen P. Ø., Christophersen L., Maling D. S., van Gennip M., Bjarnsholt T., Hougen H. P., Givskov M., Jacobsen G. K., Høiby N. Thermal injury induces impaired function in polymorphonuclear neutrophil granulocytes and reduced control of burn wound infection. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156 (1): 102–110. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03861.x.
47. Li D., Gromov K., Soballe K., Puzas J. E., O'Keefe R. J., Awad H., Drissi H., Schwarz E. M. Quantitative mouse model of implant-associated osteomyelitis and the kinetics of microbial growth, osteolysis, and humoral immunity. *J Orthop Res.* 2008; 26 (1): 96–105. doi: 10.1002/jor.20452.
48. Bjarnsholt T., Jensen P. Ø., Jakobsen T. H., Phipps R., Nielsen A. K., Rybte M. T., Tolker-Nielsen T., Givskov M., Høiby N., Ciofu O., Scandianavian Cystic Fibrosis Study Consortium. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2010; 5 (4): 10115. doi: 10.1371/journal.pone.0010115.
49. van Heeckeren A. M., Schluchter M. D., Xue W., Davis P. B. Response to acute lung infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173 (3): 288–296. doi: 10.1164/rccm.200506-917OC.
50. Buret A., Ward K. H., Olson M. E., Costerton J. W. An *in vivo* model to study the pathobiology of infectious biofilms on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25 (7): 865–874. doi: 10.1002/jbm.820250706. PMID: 1918103.
51. Costerton J. W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. Biofilms, the customized microclimate. *J Bacteriol.* 1994; 76 (8): 2137–2142. doi: 10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994.
52. Juu-Ching Shu, Chi-Yu Hsu, Chih-Ching Wu, Mei-Hui Lin, Chien-Cheng Chen, Ching-Hsi Hsiao. The *in vivo* biofilm formation of *Staphylococcus aureus* in a mouse model: albumin is the major biofilm matrix (preprint). doi: 10.21203/rs.3.rs-3368672/v1.

Поступила / Received 01.11.2024

Принята в печать / Accepted 15.11.2024

Информация об авторах

Даудова Адиля Джигангировна — к. м. н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8607-2395

Демина Юлия Заурбековна — старший преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0428-2570.

Рубальский Олег Васильевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2904-9276

Ясенявская Анна Леонидовна — к. м. н., доцент, руководитель Научно-исследовательского центра, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864.

About the authors

Adilya D. Daudova — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8607-2395

Yuliya Z. Demina — Senior lecturer of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0428-2570

Oleg V. Rubalsky — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2904-9276

Anna L. Yasyavskaya — Ph. D. in Medicine, Associate Professor, Head of the Research Center, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864.

Acinetobacter baumannii: механизмы антимикробной резистентности

Н. Е. БАРАНЦЕВИЧ, Л. В. ИВАНОВА, *Е. П. БАРАНЦЕВИЧ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Грамотрицательные неферментирующие бактерии *Acinetobacter baumannii* являются частой причиной тяжёлых осложнений (пневмония, бактериемия, сепсис) в клинике внутренних болезней, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом: 3,2% случаев бактериемии и сепсиса обусловлены *A. baumannii*, летальность составляет 26–91%. *A. baumannii* обладает способностью быстро приобретать устойчивость к антимикробным препаратам. За последние десятилетия появились штаммы с множественной резистентностью к антимикробным препаратам, в том числе к бета-лактамам, включая карбапенемы, аминогликозидам, фторхинолонам — препаратам выбора при лечении тяжёлых госпитальных инфекций, обусловленных грамотрицательными микроорганизмами. В мире около 45% изолятов *A. baumannii* обладают множественной лекарственной устойчивостью, на Ближнем Востоке, в Южной Европе и Северной Африке мультирезистентность достигает 90%, в Китае — 60%. Распространённость полирезистентных штаммов *A. baumannii* у пациентов с внутрибольничной пневмонией, связанной с искусственной вентиляцией лёгких, оценивается в 80%. Основные механизмы антимикробной резистентности возбудителя — нарушение проницаемости клеточной стенки для антибиотиков в результате модификации пориновых белков, активация систем эффлюксной помпы, продукция ферментов, разрушающих антибактериальные препараты, образование биоплёнки. В обзоре рассматриваются молекулярные основы формирования резистентности к антибактериальным препаратам у *A. baumannii*.

Ключевые слова: устойчивость; карбапенемы; аминогликозиды; фторхинолоны; антибиотики; тигециклин; полимиксин; сульбактам; летальность; системы эффлюкса

Для цитирования: Баранцевич Н. Е., Иванова Л. В., Баранцевич Е. П. *Acinetobacter baumannii*: механизмы антимикробной резистентности. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 93–100. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-93-100>. EDN: FTYMQR.

Acinetobacter baumannii: Mechanisms of Antimicrobial Resistance

NATALIA E. BARANTSEVICH, LARISA V. IVANOVA, *ELENA P. BARANTSEVICH

Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

Abstract

Gram-negative non-fermenting bacteria *Acinetobacter baumannii* are a common cause of severe complications (pneumonia, bacteremia, sepsis) in the clinic of internal diseases, especially in patients with weakened immune system: 3,2% of bacteremia and sepsis cases are associated with *A. baumannii*, with mortality rate 26–91%. *A. baumannii* has the ability to rapidly acquire antimicrobial resistance. In recent decades, strains with multiple resistance to antimicrobial drugs have emerged, including beta-lactams, including carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones, which are the drugs of choice in the treatment of severe hospital infections caused by Gram-negative microorganisms. Globally, about 45% of *A. baumannii* isolates are multidrug-resistant, with multidrug resistance reaching 90% in the Middle East, Southern Europe, and North Africa, and 60% in China. The prevalence of polyresistant strains of *A. baumannii* in patients with nosocomial pneumonia associated with mechanical ventilation is estimated at 80%. The main mechanisms of antimicrobial resistance of the pathogen are impaired permeability of the cell wall to antibiotics as a result of modification of porin proteins, activation of efflux pump systems, production of enzymes that destroy antibacterial drugs, and biofilm formation. The review examines the molecular basis of the formation of resistance to antibacterial drugs in *A. baumannii*.

Keywords: resistance; carbapenems; aminoglycosides; fluoroquinolones; antibiotics; tigecycline; polymyxin; sulbactam; mortality; efflux systems

For citation: Barantsevich N. E., Ivanova L. V., Barantsevich E. P. *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of antimicrobial resistance. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (11–12): 93–100. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-93-100>. EDN: FTYMQR. (in Russian)

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: lenabara2003@inbox.ru



*Correspondence to:
E-mail: lenabara2003@inbox.ru

EDN: FTYMQR



Acinetobacter baumannii — условно-патогенные грамотрицательные бактерии, которые являются частой причиной тяжёлых осложнений в стационаре (пневмония, бактериемия, сепсис), особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом, нейтропенией и полиорганной патологией [1–5]. Такие осложнения приводят к повышению летальности пациентов и сроков пребывания в стационаре [6–9]. *A. baumannii* способен колонизировать кишечник, носоглотку, кожу и верхние дыхательные пути человека, что повышает риск инвазивной инфекции [10–12]. *A. baumannii* хорошо выживает в условиях стационара, обладает исключительной устойчивостью к дезинфицирующим средствам и часто обнаруживается на медицинском оборудовании и объектах больничной среды [10, 13]. Он более месяца может сохранять жизнеспособность на сухих поверхностях [1], что обуславливает высокий патогенный потенциал микроорганизма и способность вызывать вспышки внутрибольничных инфекций, которые чаще всего возникают в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), в ожоговых отделениях [14–17].

Последние три десятилетия во всех регионах мира отмечают рост заболеваемости инфекциями, обусловленными *A. baumannii*, и высокий уровень летальности (26–91%), особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом [18]. Многоцентровое исследование SENTRY показало, что *A. baumannii* является девятой по частоте причиной нозокомиальных бактериемии и сепсиса, будучи ответственным за 3,2% таких состояний [19, 20]. Во время пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19) отмечали высокую частоту коинфекций, вызванных мультирезистентными штаммами *A. baumannii* у тяжёлых больных [21–24] и высокий процент летальности таких пациентов [25–27].

A. baumannii обладает способностью быстро приобретать устойчивость к антимикробным препаратам [28–30]. За последние десятилетия среди *A. baumannii*, как и среди других грамотрицательных бактерий, появились и широко распространились штаммы с множественной резистентностью к антимикробным препаратам, в том числе к бета-лактамам, включая карбапенемы, аминогликозидам, фторхинолонам — препаратам выбора для терапии тяжёлых госпитальных инфекций, вызванных грамотрицательными возбудителями [31–34]. Возрастающее количество штаммов обладают устойчивостью к тигециклину и полимиксином [6, 7, 35, 36]. Частота появления штаммов с множественной лекарственной устойчивостью у *A. baumannii* примерно в четыре раза выше, чем у других возбудителей внутрибольничных инфекций. В Южной Европе, Северной Африке и на Ближнем Востоке до 90% клинических изолятов *A. baumannii* устойчивы к карбапене-

мам [20, 37]. Во всём мире около 45% изолятов *A. baumannii* обладают множественной лекарственной устойчивостью, в Китае доля полирезистентных штаммов *A. baumannii* выросла до 60%. Распространённость полирезистентных штаммов *A. baumannii* у пациентов с внутрибольничной пневмонией, связанной с искусственной вентиляцией лёгких, оценивается в 80% [14, 38–40]. В 2017 г. *A. baumannii* с множественной лекарственной устойчивостью был включён Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в список глобальных приоритетных патогенов, требующих всемерного содействия в проведении исследований и разработке новых и эффективных методов лечения [1, 2, 38].

Основные механизмы резистентности к антимикробным препаратам у *A. baumannii* — это нарушение проницаемости клеточной стенки микроорганизма для антибиотиков в результате модификации пориновых белков [41], активация систем эффлюксной помпы [41–43], продукция ферментов, разрушающих антибактериальные препараты [44–47], образование биоплёнки [48].

Транспорт антибактериальных препаратов через клеточную стенку у грамотрицательных возбудителей осуществляется посредством пориновых каналов [41]. При модификации пориновых белков проницаемость клеточной стенки микроорганизма для антибиотиков изменяется, антимикробный препарат не проникает в бактериальную клетку, и в результате наблюдается резистентность к антимикробным препаратам. Пориновые белки, модификация которых часто связана с антимикробной резистентностью у *A. baumannii*, это, преимущественно, CarO, HMP, OprD [49, 50].

Активное выведение антибактериальных средств из клетки достигается за счёт эффлюксных насосов — мембранных белков, вытесняющих антимикробные средства из бактериальной клетки. Эффлюксные помпы подразделяются на семейства RND, MATE, MFS, SMR, ABC, PACE [42, 49]. Эффлюксные помпы семейства RND, в основном представленные AdeABC, AdeIJK, AdeDE и AdeFGH, являются наиболее изученным семейством эффлюксных насосов *A. baumannii*. AdeABC является наиболее значимой системой эффлюкса у *A. baumannii*. Точечные мутации в гене *adeS*, основном гене, регулирующем данную систему, способствуют повышению активности эффлюксных механизмов [51, 52]. AdeIJK может выводить из бактериальной клетки карбапенемы, фторхинолоны, тетрациклин, линкомицин, неомицин и тигециклин. AdeFGH способствует выведению фторхинолонов, макролидов и тетрациклинов, но не аминогликозидов и бета-лактамов. AdeDE система снижает концентрацию цефтазида и рифампицина в бактериальной клетке [51–53].

Эффлюксные насосы семейства MFS включают в себя системы CsaA, AmvA, TetA и TetB. CsaA связана с резистентностью к хлорамфениколу, AmvA — с выведением дезинфицирующих средств из бактериальной клетки. TetA способствует развитию резистентности к тетрациклам, TetB — к тетрациклам и миноциклину, они не встречаются в одном штамме [51, 52]. AbeM эффлюксная помпа относится к семейству MATE и связана с резистентностью *A. baumannii* к различным антимикробным препаратам, таким как аминогликозиды, фторхинолоны, сульфаниламиды и хлорамфеникол [53]. Эффлюксные помпы семейства ABC, более характерные для эукариотических клеток (грибов, животных), встречаются у *A. baumannii*. Так, помпы MacAB-TolC выводят эритромицин и грамицидин из клеток микроорганизма [51, 53]. Помпы семейства SMR AbeS выводят из бактериальной клетки бета-лактамы, хлорамфеникол, цiproфлоксацин, эритромицин, новобиоцин [49, 53]. В семействе PACE для помп AceI субстратом является хлоргексидин [53, 54].

A. baumannii способен продуцировать ферменты, разрушающие разнообразные антимикробные препараты — бета-лактамы, аминогликозиды, тетрациклины, фторхинолоны. β -лактамазы — гидролазы, разрушающие бета-лактамные кольца, приводят к резистентности к различным бета-лактамам [55]. *A. baumannii* может вырабатывать β -лактамазы классов A, B, C и D по Амблеру. Классы A, C и D включают сериновые ферменты, содержащие в активном центре ион серы, класс B или металло- β -лактамазы отличаются наличием иона металла (цинка) в каталитическом центре [55–57]. β -лактамазы расширенного спектра действия (ESBL) чаще всего встречаются среди ферментов класса A, однако они присутствуют также среди β -лактамаз классов C и D. Их наличие связано с резистентностью микроорганизмов к пеницилинам и 1–3 поколению цефалоспоринов [58].

Энзимы класса A (KPC, GES-14) связаны с резистентностью к пеницилинам, цефалоспорином I–V поколения, карбапенемам, азтреонаму [55, 58]. β -лактамазы класса C (AmpC) являются причиной резистентности *A. baumannii* к цефалоспорином третьего поколения [49, 55]. β -лактамазы класса D также называют оксациллиназами (OXA) из-за их способности гидролизовать полусинтетические пенициллины, такие как оксациллин. Они могут обладать гидролитической активностью в отношении пенициллинов, цефалоспоринов и карбапенемов. Среди оксациллиназ у *A. baumannii* преобладают ферменты OXA23 и OXA24, а также OXA51, OXA58, OXA143 и OXA235, обеспечивающие устойчивость микробной клетки к карбапенемам [57, 59]. Все перечисленные оксациллиназы, кроме OXA51, кодируются

приобретёнными генами резистентности, OXA51 считают врождённой хромосомной оксациллиназой, характерной для *A. baumannii*. Она обладает низкой каталитической активностью, однако может быть легко сверхэкспрессирована активацией промотора посредством вставочных последовательностей, таких как ISAbal [2, 60]. β -лактамазы класса B обеспечивают гидролиз всех бета-лактамов (включая карбапенемы), кроме азтреонама. Они характеризуются очень высокой (в 100–1000 раз выше, чем OXA) активностью в отношении карбапенемов и представлены семействами IMP, VIM, SIM, NDM. Микроорганизмы, несущие ген NDM-1, нередко проявляют панрезистентность к антимикробным препаратам [49, 59].

Интересно, что штаммы *A. baumannii*, несущие гены OXA-51 и OXA-23, способны к лучшему образованию биоплёнок по сравнению с штаммами, обладающими генами AmpC, TEM, NDM-1 и KPC [61]. Сульбактам представляет собой ингибитор β -лактамаз класса A, его нередко применяют в комбинации с дурлобактамом, который восстанавливает активность сульбактама в отношении *A. baumannii* за счёт ингибирования различных бета-лактамаз классов A, C и D [62]. Механизмы резистентности *A. baumannii* к сульбактаму и дурлобактаму недостаточно изучены. В ряде исследований сообщалось о точечных мутациях в генах, кодирующих пенициллинсвязывающие белки PBP1a, PBP1b, PBP2, PBP3 и о присутствии в устойчивых штаммах NDM-1, OXA-23, OXA-24, OXA-72 [62, 63]. В резистентных к сульбактаму штаммах *A. baumannii* выявлены точечные мутации T526S, A515V, N392T, I517N и V565L в гене *PBP3*, G181S и Q644K в гене *PBP1a* и P545L в гене *PBP1b*; при применении дурлобактама была определена мутация P662T в гене *PBP2* [62].

Аминогликозиды часто применяются для терапии инфекций, вызванных грамотрицательными микроорганизмами. Их механизм действия связан с ингибирующим действием на 30S субъединицу рибосомы микроорганизма [49]. *A. baumannii* приобретает устойчивость к аминогликозидам, включая амикацин, посредством следующих механизмов резистентности: модификация рибосом, инактивация препарата с помощью аминогликозид-модифицирующих ферментов, снижение экспрессии генов, кодирующих белки пориновых каналов, систем эффлюкса [64–67].

Ферменты, приводящие к резистентности, это аминогликозидацетилтрансферазы (AAC), которые катализируют ацетилкоэнзим A-зависимое ацетилирование аминокислот, аминогликозиднуклеотидилтрансферазы (ANT) переносят аденильную группу с АТФ на гидроксильную группу антибиотика, аминогликозидфосфотрансферазы (APH) катализируют АТФ-зависимое фосфорилирование гидроксильной группы аминогликозидов [65].

Гены, кодирующие продукцию аминокликозид-модифицирующих ферментов, могут находиться как на хромосомах, так и на мобильных генетических элементах. AAC (3')-Ia связан с устойчивостью к тобрамицину и амикацину; AAC (3')-IIa — к канамицину; ANT (2')-Ia — к тобрамицину, гентамицину, канамицину и амикацину и APH (3')-VIa — к амикацину и канамицину. Особую опасность представляет собой появление бифункциональных ферментов, способных к модификации практически всех аминокликозидных антимикробных препаратов [66–69]. Метилирование 16S рРНК у *A. baumannii*, опосредованное генами 16S рРНК-метилазы (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* и *npmA*), также снижает чувствительность к аминокликозидам [67]. Если аминокликозид-модифицирующие ферменты различаются по действию на различные аминокликозидные препараты, то 16S рРНК-метилазы приводят к резистентности практически ко всем аминокликозидам, кроме стрептомицина [65–67].

Фторхинолоны действуют на микробные клетки бактериостатически, ингибируя репликацию и транскрипцию ДНК, благодаря воздействию на ферменты топоизомеразы [49]. Резистентность к фторхинолонам может быть обусловлена модификацией топоизомераз, а также изменениями структуры белка наружной мембраны и снижением проницаемости клеточной стенки [70]. Устойчивость к хинолонам у *A. baumannii* в первую очередь вызвана мутациями фермента-мишени, включая ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, кодируемых генами *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* [70, 71]. Мутации в отдельных генах *gyrA* приводят к умеренной резистентности, тогда как совместные мутации в генах *gyrA* и *parC* приводят к высоким значениям МПК [49, 72].

Тигециклин, первый глицилциклинный антимикробный препарат, разрешённый для применения в клинической практике, активно проникает в разнообразные ткани организма, но плохо проникает через гематоэнцефалический барьер [73]. Тигециклин изначально был разработан для терапии полимикробных инфекций, вызванных мультирезистентными грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами. В опытах *in vitro* препарат демонстрирует длительный постантибиотический эффект [74, 75]. Тигециклин является бактериостатическим антимикробным средством, механизм действия которого сходен с препаратами тетрациклинового ряда и проявляется в ингибировании трансляции белков микроорганизмов [76]. Данный эффект достигается благодаря прикреплению к 16S рРНК 30S субъединицы бактериальной рибосомы [49]. Механизмы резистентности к тигециклину включают в себя повышенную активность системы эффлюкса, изменение проницаемости внешней мембраны, продукцию ферментов, при-

водящих к деактивации антимикробного препарата, модификацию мишени действия и репарацию после повреждения [76]. Резистентность к препаратам тетрациклинового ряда — модификация мишени (рибосомальные мутации) — преодолевается за счёт боковой цепи тигециклина [77]. Резистентность к данному препарату часто обусловлена лекарственными помпами RND — AdeABC, AdeFGH, AdeIJK, которые контролируются транскрипционными регуляторами AdeRS, AdeL и AdeN, соответственно. AdeIJK обнаруживается во всех штаммах *A. baumannii* [76, 78]. Резистентность к тигециклину может быть связана с флаavin-зависимыми монооксигеназами Tet(X), способными к разрушению тетрациклинов гидроксигированием и передающихся с помощью плазмид. Наибольшую озабоченность относительно резистентности к тигециклину вызывают такие ферменты, как Tet(X3), Tet(X4), Tet(X5) [76, 79]. Другим механизмом резистентности *A. baumannii* является восстановление ДНК. Пути репарации RecA и RecBCD восстанавливают ДНК после оксидативного повреждения [80].

Полимиксины (полимиксин В и полимиксин Е или колистин), разрушая структуру липополисахаридов (LPS) в клеточной стенке грамотрицательных бактерий, способствуют увеличению её проницаемости, потере барьерной функции, что, в конечном итоге, приводит к гибели микроорганизма [81]. Механизмы, лежащие в основе устойчивости к полимиксинам у *A. baumannii*, включают в себя потерю LPS и модификацию структуры липополисахаридов и липида А, активность эффлюксной помпы, мутации в генах, кодирующих белки наружной мембраны, недостаточную концентрацию кофакторов, необходимых для образования LPS и мобильные гены резистентности *mcr* [2, 49, 82, 83].

Устойчивость к колистину часто сопряжена с полным исчезновением липополисахаридов у *A. baumannii* и возникает в результате мутаций в генах *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, участвующих в выработке липида А [49, 83]. Мутации в оперонах *pmrB* (A138T, A226V, и A444V), *pmrA* (G54E), *pmrC* (I42V, L150F, R109H), *nahD* приводят к модификации липида А и устойчивости к полимиксинам [2, 42, 82]. Комбинация мутаций в *lpxC*, *lpxD* и *pmrAB*, в генах *pmrC* (R125P) и *pmrB* оказывает синергический эффект на устойчивость *A. baumannii* к колистину. Двухкомпонентные системы PmrA-PmrB (PmrAB) и PhoP-PhoQ (PhoPQ) уменьшают отрицательный заряд LPS, предотвращая тем самым электростатическое взаимодействие с полимиксинами [49, 82, 83]. Ещё одним механизмом устойчивости является повышенная активность генов, кодирующих эффлюксные помпы (*adeI*, *adeC*, *emrB*, *mexB* и *macAB*). Активизация систем эффлюкса EmrAB, MexAB-OpzM и точечная мутация N104M в гене *ttg2C* коррелируют с резистент-

ностью к колистину [42, 83]. Мутации в генах, кодирующих белки — компоненты наружной мембраны, *lpsB* (H181Y, *241K, D146G, G218H, E219S и T331I), *lptD*, *vacJ* (R166N и Q249T), *pldA* (T200T) приводят к дефектам проницаемости и изменению осмотического сопротивления мембран, что нередко наблюдается у *A. baumannii*, устойчивых к полимиксинам. Нарушение транспорта LPS из цитозоля может быть связано с мутациями в гене *lptD* и умеренной устойчивостью к полимиксину В [42, 54, 83]. Недостаточная концентрация кофакторов, участвующих в синтезе LPS, таких как биотин, влияет на чувствительность *A. baumannii* к полимиксинам.

Делеции в гене *lpsB*, который кодирует гликозилтрансферазу, участвующую в синтезе биотина, связаны с устойчивостью к колистину [42]. Плазмидные гены *mcr* кодируют белок, который катализирует присоединение фосфоэтаноламина к липиду А липополисахарида, что снижает сродство полимиксинов к бактериальной мембране. Известно десять генов *mcr* (*mcr-1* — *mcr-10*), связанных с резистентностью к полимиксинам и представляющих серьёзную угрозу из-за риска горизонтального переноса. Большинство изолятов *A. baumannii*, несущих гены *mcr*, мультирезистентны. У *A. baumannii* наиболее часто выявляются варианты *mcr-1* и *mcr-4.3* [82, 83]. Ген *mcr-1* способен автономно вызывать устойчивость к колистину и приводит к 4–8-кратному увеличению его минимальных подавляющих концентраций (МПК). Плазмиды IncX4, IncHI1, IncHI2, IncP, IncI2 и IncY участвуют в переносе *mcr-1*, из них наиболее распространены IncI2 и IncX4. В некоторых плаزمидеях наряду с *mcr* присутствуют гены, кодирующие карбапенемазы NDM-1, NDM-5, KPC-2 и KPC-3 [42, 82, 84].

A. baumannii обладают способностью к формированию биоплёнок, что, в свою очередь, связано с значительным ростом резистентности: они могут лимитировать диффузию антимикробных

препаратов к месту их действия [85–87]. Показано, что 100% мультирезистентных штаммов этого микроорганизма обладают способностью формировать биоплёнки. Согласно исследованию, проведённому в Иране, 92% штаммов, формирующих биоплёнки, были мультирезистентными, 86% — экстремально резистентными. Биоплёнки способствуют сохранению и выживанию *A. baumannii* в больничной среде. Формирование биоплёнок может приводить к развитию инфекций, таких как бактериемия, сепсис, инфекции мочевыводительного тракта, благодаря образованию таких формаций на различных катетерах; вентилятор-ассоциированных пневмоний — благодаря образованию биоплёнок на эндотрахеальных трубках [85, 86]. Бактериемия, сепсис и инфекции мочевыводительной системы вызываются штаммами, образующими биоплёнки [73, 88, 89].

Таким образом, *A. baumannii* обладает разнообразными механизмами устойчивости к антимикробным препаратам, способен быстро мутировать, особенно в условиях селективного давления антибиотиков. Значительная часть госпитальных штаммов демонстрирует антимикробную мультирезистентность, что обуславливает необходимость разработки новых подходов к преодолению устойчивости к антибиотикам наряду с продолжением исследования все новых формирующихся механизмов антимикробной резистентности и молекулярной эпидемиологии возбудителя.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Баранцевич Наталья Евгеньевна — анализ литературы, написание текста, редактирование; Иванова Лариса Викторовна — анализ литературы, написание текста; Баранцевич Елена Петровна — написание текста, редактирование, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

1. Ren X., Palmer L. D. Acinetobacter metabolism in infection and antimicrobial resistance. *Infect Immun.* 2023; 91 (6): e0043322. doi: 10.1128/iai.00433-22.
2. Wu H.J., Xiao Z. G., Lv X.J., Huang H. T., Liao C., Hui C. Y. et al. Drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: from molecular mechanisms to potential therapeutics (Review). *Exp Ther Med.* 2023; 25 (5): 209. doi: 10.3892/etm.2023.11908.
3. Cavallo I., Oliva A., Pages R., Sivori F., Truglio M., Fabrizio G. et al. *Acinetobacter baumannii* in the critically ill: complex infections get complicated. *Front Microbiol.* 2023; 14: 1196774. doi: 10.3389/fmicb.2023.1196774.
4. Свицнунов С. А., Кузин А. А., Суборова Т. Н., Огарков П. И., Жарков Д. А., Медведев И. Ю. Роль *Acinetobacter* spp. в этиологии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, у пациентов хирургического стационара. Медицина в Кузбассе. 2013; 12 (2): 59–62. [Svitsunov S. A., Kuzin A. A., Suborova T. N., Ogarkov P. I., Zharkov D. A., Medvedev I. Y. The role of *Acinetobacter* spp. in health care-associated infections etiology in patients of surgical departments. *Meditina v Kuzbasse.* 2013; 12 (2): 59–62. (in Russian)]
5. Denissen J., Reyneke B., Waso-Reyneke M., Havenga B., Barnard T., Khan S. et al. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment:

- Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *Int J Hyg Environ Health.* 2022; 244: 114006. doi: 10.1016/j.ijheh.2022.114006.
6. Sun C., Yu Y., Hua X. Resistance mechanisms of tigeicycline in *Acinetobacter baumannii*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2023; 13: 1141490. doi: 10.3389/fcimb.2023.1141490.
 7. Park J., Kim M., Shin B., Kang M., Yang J., Lee T. K. et al. A novel decoy strategy for polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Elife.* 2021; 10: e66988. doi: 10.7554/eLife.66988.
 8. Lupo A., Haenni M., Madec J. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol Spectr.* 2018; 6: 10.1128/microbiolspec.arba-0007-2017. doi: 10.1128/microbiolspec.arba-0007-2017.
 9. Гончарова А. Р., Гостев В. В., Краева Л. А., Полев Д. Е., Гончаров Н. Е., Сaitова А. Т. и др. Фенотипическая и молекулярная характеристика изолятов *Acinetobacter baumannii*, выделенных при нозокомальных инфекциях с летальными исходами. Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (1): 60–65. doi: https://doi.org/10.24412/1999-6780-2024-1-60-65. [Goncharova A. R., Gostev V. V., Kraeva L. A., Polev D. E., Goncharov N. E., Saitova A. T. et al. Phenotypical and molecular-genetic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from nosocomial infections with fatal outcomes. *Problems in Medical Mycology.* 2024; 26 (1): 60–65. (in Russian)]

10. Шмакова М. А. Бактерии рода *Acinetobacter* как внутрибольничные патогены: эпидемиологические особенности. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019; 1: 66–72. [Shmakova M. A. *Acinetobacter* spp. as healthcare-associated pathogens: epidemiological features. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2019; 4 (1): 66–72. (in Russian)]
11. Timsit J. F., Garrat V., Misset B., Goldstein F. W., Renaud B., Carlet J. The digestive tract is a major site for *Acinetobacter baumannii* colonization in intensive care unit patients. *J Infect Dis*. 1993; 168 (5): 1336–1337. doi: 10.1093/infdis/168.5.1336.
12. Горбич Ю. Л., Карпов И. А., Кречикова О. И. Инфекции, вызванные *Acinetobacter baumannii*: факторы риска, диагностика, лечение, подходы к профилактике. *Медицинские новости*. 2011; 5: 31–39. [Gorbich Yu. L., Karpov I. A., Krechikova O. I. Infektsii, vyzvannye *Acinetobacter baumannii*: faktory riska, diagnostika, lechenie, podkhody k profilaktike. *Meditsinskie novosti*. 2011; 5: 31–39. (in Russian)]
13. Ayats J., Corbella X., Ardanuy C., Domínguez M. A., Ricart A., Ariza J. et al. Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal, and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in ICU patients. *J Hosp Infect*. 1997; 37 (4): 287–295. doi: 10.1016/s0195-6701(97)90145-6.
14. Zheng Y., Xu N., Pang J., Han H., Yang H., Qin W. et al. Colonization with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and prognosis in critically ill patients: an observational cohort study. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8: 667776. doi: 10.3389/fmed.2021.667776.
15. Knauf G. A., Powers M. J., Herrera C. M., Trent M. S., Davies B. W. Acinetobactin-mediated inhibition of commensal bacteria by *Acinetobacter baumannii*. *mSphere*. 2022; 7 (1): e0001622. doi: 10.1128/msphere.00016-22.
16. Wong S. C., Chen J. H., Chau P. H., So S.Y., AuYeung C.H., Yuen L. L. et al. Gastrointestinal colonization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: what is the implication for infection control? *Antibiotics (Basel)*. 2022; 11 (10): 1297. Published 2022 Sep 22. doi: 10.3390/antibiotics11101297.
17. Martín-Aspas A., Guerrero-Sánchez F. M., García-Colchero F., Rodríguez-Roca S., Girón-González J. A. Differential characteristics of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: risk factors, clinical picture, and mortality. *Infect Drug Resist*. 2018; 11: 861–872. doi: 10.2147/IDR.S163944.
18. Itani R., Khojah H. M.J., Karout S., Rahme D., Hammoud L., Awad R. et al. *Acinetobacter baumannii*: assessing susceptibility patterns, management practices, and mortality predictors in a tertiary teaching hospital in Lebanon. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2023; 12 (1): 136. doi: 10.1186/s13756-023-01343-8.
19. Diekema D. J., Hsueh P. R., Mendes R. E., Pfaller M. A., Rolston K. V., Sader H. S., Jones R. N. The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019; 63 (7): e00355-19. doi: 10.1128/AAC.00355-19.
20. Nutman A., Temkin E., Wullfhart L., Schechner V., Schwaber M. J., Carmeli Y. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections: a nationwide study in Israel. *Microorganisms*. 2023; 11 (9): 2178. doi: 10.3390/microorganisms11092178.
21. Andrianopoulos I., Maniatiopoulou T., Lagos N., Kazakos N., Papatheanasiou A., Papathanakos G. et al. *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in the COVID-19 era: a comparative analysis between COVID-19 and non-COVID-19 critically ill patients. *Microorganisms*. 2023; 11 (7): 1811. doi: 10.3390/microorganisms11071811.
22. Rangel K., De-Simone S. G. *Acinetobacter baumannii* during COVID-19: what is the real pandemic? *Pathogens*. 2022; 12 (1): 41. doi: 10.3390/pathogens12010041.
23. Vrancianu C. O., Cristian R-E., Dobre E-G., Zenoaga-Barbarosie C., Chirea E-T., Crunteanu I. et al. The impact of *Acinetobacter baumannii* infections in COVID-19 patients admitted in hospital intensive care units. *Biol. Life Sci. Forum*. 2024; 31: 1. doi: https://doi.org/10.3390/ECM2023-16479.
24. Toumy A., Rageh F., Riad E., Sakr M. A., Abdelhady S. A., Elgamal R. et al. Incidence of co-infection and its impact on COVID-19 patients admitted in the intensive care unit. *Egyptian Journal of Anaesthesia*. 2023; 39 (1): 141–148. doi: https://doi.org/10.1080/11101849.2023.2175404.
25. Alenazi T. A., Shaman M. S. B., Suliman D. M., Alanazi T. A., Altawalbeh S. M., Alshareef H., et al. The impact of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill patients with or without COVID-19 infection. *Healthcare (Basel)*. 2023; 11 (4): 487. doi: 10.3390/healthcare11040487.
26. Boral J., Genç Z., Pınarlıyk F., Ekinci G., Kuskucu M. A., Yrkören P. et al. The association between *Acinetobacter baumannii* infections and the COVID-19 pandemic in an intensive care unit. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 20808. doi: 10.1038/s41598-022-25493-8.
27. AliMohammadi A., Chezani-Sharahi N., Hezaveh Z. A., Abbasi E., Shariati A., Ghaznavi-Rad E. The significant role of carbapenems-resistant *Acinetobacter baumannii* in mortality rate of patients with COVID-19. *Vacunas*. 2023; 24 (1): 13–18. doi: 10.1016/j.vacun.2022.10.004.
28. Agyepong N., Fordjour F., Owusu-Ofori A. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings in Africa. *Front. Trop. Dis*. 2023; 4: 1110125. doi: 10.3389/ftd.2023.1110125.
29. Ibrahim S., Al-Saryi N., Al-Kadmy I. M.S., Aziz S. N. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Mol Biol Rep*. 2021; 48 (10): 6987–6998. doi: 10.1007/s11033-021-06690-6.
30. Weinberg S. E., Villedieu A., Bagdasarian N., Karah N., Teare L., Elamin W. F. Control and management of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: A review of the evidence and proposal of novel approaches. *Infect Prev Pract*. 2020; 2 (3): 100077. doi: 10.1016/j.infpip.2020.100077.
31. Козлова Н. С., Баранцевич Н. Е., Иванова Л. В., Гоик В. Г., Баранцевич Е. П. Антибиотикорезистентность энтеробактерий, выделенных из мочи пациентов многопрофильного стационара. *Проблемы медицинской микологии*. 2015; 17 (3): 22–26. [Kozlova N. S., Barantsevich N. E., Ivanova L. V., Goik V. G., Barantsevich E. P. Resistance to antibiotics in Enterobacteriaceae, isolated from urine in a multidisciplinary medical centre. *Problemy meditsinskoi mikologii*. 2015; 17 (3): 22–26 (in Russian)]
32. Yousefi Nojookambari N., Sadredinamin M., Dehbanipour R., Ghalavand Z., Eslami G., Vaezjalali M. et al. Prevalence of β -lactamase-encoding genes and molecular typing of *Acinetobacter baumannii* isolates carrying carbapenemase OXA-24 in children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021; 20 (1): 75. doi: 10.1186/s12941-021-00480-5.
33. Чеботарь И. В., Крыжановская О. А., Алябьева Н. М., Савинова Т. А., Бочарова Ю. А., Лазарева А. В., и др. Генотипы и носительство генов β -лактамаз у карбапенеморезистентных штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных в г. Москве. *Антибиотики и химиотер*. 2017; 62 (11–12): 29–34. [Chebotar I. V., Kryzhanovskaya O. A., Alyabieva N. M., Savinova T. A., Bocharova Yu. A., Lazareva A. V., Poli-karpova S. V., Karaseva O. V., Mayanskiy N. F. Genotypes and β -lactamase gene carriage in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in Moscow. *Antibiot Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2017; 62 (11–12): 29–34. (in Russian)]
34. Баранцевич Н. Е., Баранцевич Е. П. Терапия сепсиса, обусловленного резистентной к карбапенемам *Klebsiella pneumoniae* у онкогематологических пациентов в современных условиях. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2022; 24 (4): 383–387. [Barantsevich N. E., Barantsevich E. P. Antimicrobial therapy of sepsis caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients with hematological malignancies. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya*. 2022; 24 (4): 383–387 (in Russian)]
35. Лазарева И. В., Агеевец В. А., Сидоренко С. В. Антибиотикорезистентность: роль карбапенемаз. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2018; 20 (3): 320–328. [Lazareva I. V., Ageevets V. A., Sidorenko S. V. Antibiotic resistance: the role of carbapenemases. *Meditsina Ekstremal'nykh Situatsiy (Medicine of Extreme Situations)*. 2018; 20 (3): 320–328. (in Russian)]
36. Шек Е. А., Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Скленова Е. Ю., Иваичик Н. В., Шайдуллина Э. Р., др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. В стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон 2015–2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21 (2): 171–180. [Shek E. A., Sukhorukova M. V., Eidel'shtein M. V., Skleenova E. Yu., Ivanchik N. V., Shaidullina E. R., et al. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial *Acinetobacter* spp. isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON 2015–2016». *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya*. 2019; 21 (2): 171–180. (in Russian)]
37. Ma C., McClean S. Mapping Global Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and recent vaccine development to tackle it. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9 (6): 570. doi: 10.3390/vaccines9060570.
38. Lee H. Y., Chen C. L., Wu S.R., Huang C. W., Chiu C. H. Risk factors and outcome analysis of *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia in critical patients. *Crit Care Med*. 2014; 42 (5): 1081–1088. doi: 10.1097/CCM.0000000000000125.
39. Гудуева Е. Н., Чемисова О. С. Факторы патогенности *Acinetobacter baumannii*. *Медицинский вестник Юга России*. 2023; 14 (1): 66–74. doi: https://doi.org/10.21886/2219-8075-2023-14-1-66-74. [Gudueva E. N., Chemisova O. S. Pathogenicity factors of *Acinetobacter baumannii*. *Medical Herald of the South of Russia*. 2023; 14 (1): 66–74. doi: https://doi.org/10.21886/2219-8075-2023-14-1-66-74. (in Russian)]
40. Mohammed Y., Muhammad A. S., Zainu S. M., Jimoh A. K., Olowo-Okere A., Ogunyinka I. A. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary health center from Northwestern Nigeria. *Ann Afr Med*. 2024; 23 (1): 40–45. doi: 10.4103/aam.aam_141_23.

41. Lee C. R., Lee J. H., Park M., Park K. S., Bae I. K., Kim Y. B. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7: 55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
42. Kyriakidis I., Vasileiou E., Pana Z. D., Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens.* 2021; 10 (3): 373. doi: 10.3390/pathogens10030373.
43. Castanheira M., Mendes R. E., Gales A. C. Global epidemiology and mechanisms of resistance of *Acinetobacter baumannii*-calcoacetatus complex. *Clin Infect Dis.* 2023; 76: S166–S178. doi: 10.1093/cid/ciad109.
44. Хохлова О. Е., Ларионова И. А., Перьянова О. В., Козлов Р. С., Эйдельштейн М. В., Модестов А. А., и др. Механизмы антибиотикорезистентности основных возбудителей гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных. *Инфекция и иммунитет.* 2021; 11 (2): 324–336. doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-TMO-1379>. [Khokhlova O. E., Larionova I. A., Perianova O. V., Kozlov R. S., Eidelshstein M. V., Modestov A. A. et al. The mechanisms of antibiotic resistance in major pathogens of purulent-inflammatory complications in cancer patients. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2021; 11 (2): 324–336. doi: 10.15789/2220-7619-TMO-1379. (in Russian)]
45. Singh H., Thangaraj P., Chakrabarti A. *Acinetobacter baumannii*: a brief account of mechanisms of multidrug resistance and current and future therapeutic management. *J Clin Diagn Res.* 2013; 7 (11): 2602–5. doi: 10.7860/JCDR/2013/6337.3626.
46. Cain A. K., Hamidian M. Portrait of a killer: uncovering resistance mechanisms and global spread of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog.* 2023; 19 (8): e1011520. doi: 10.1371/journal.ppat.1011520.
47. Rafailidis P., Panagopoulos P., Koutserimpas C., Samonis G. Current therapeutic approaches for multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Antibiotics (Basel).* 2024; 13 (3): 261. doi: 10.3390/antibiotics13030261.
48. Naseef Pathoor N., Viswanathan A., Wadhwa G., Ganesh P. S. Understanding the biofilm development of *Acinetobacter baumannii* and novel strategies to combat infection. *APMIS.* 2024; 132 (5): 317–335. doi: 10.1111/apm.13399.
49. Shi J., Cheng J., Liu S., Zhu Y., Zhu M. *Acinetobacter baumannii*: an evolving and cunning opponent. *Front Microbiol.* 2024; 15: 1332108. doi: 10.3389/fmicb.2024.1332108.
50. Marino A., Augello E., Stracquadanio S., Bellanca C. M., Cosentino E., Spampinato S. et al. Unveiling the secrets of *Acinetobacter baumannii*: resistance, current treatments, and future innovations. *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (13): 6814. doi: 10.3390/ijms25136814.
51. Saikia S., Gogoi I., Puzari M., Sharma M., Chetia P. Identification of novel drug targets to counteract efflux pump mediated multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Gene Reports.* 2024; 37: 102013.
52. Abdi S. N., Ghotaslou R., Ganbarov K., Mobed A., Tanomand A., Yousefi M. et al. *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infect Drug Resist.* 2020; 13: 423–434. doi: 10.2147/IDR.S228089.
53. Zack K. M., Sorenson T., Joshi S. G. Types and mechanisms of efflux pump systems and the potential of efflux pump inhibitors in the restoration of antimicrobial susceptibility, with a special reference to *Acinetobacter baumannii*. *Pathogens.* 2024; 13 (3): 197. doi: 10.3390/pathogens13030197.
54. Gaurav A., Bakht P., Saini M., Pandey S., Pathania R. Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology.* 2023; 169: 001333. doi: 10.1099/mic.0.001333.
55. Garnacho-Montero J., Timsit J. F. Managing *Acinetobacter baumannii* infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2019; 32 (1): 69–76. doi: 10.1097/QCO.0000000000000518.
56. Morrison L., Zembower T. R. Antimicrobial resistance. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2020; 30 (4): 619–635. doi: 10.1016/j.giec.2020.06.004.
57. Evans B. A., Amyes S. G. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27 (2): 241–63. doi: 10.1128/CMR.00117-13.
58. Saral A., Leonard D. A., Duzgun A. O., Cicek A. C., June C. M., Sandalli C. Kinetic characterization of GES-22 β -lactamase harboring the M169L clinical mutation. *J Antibiot (Tokyo).* 2016; 69 (12): 858–862. doi: 10.1038/ja.2016.48.
59. Крыжановская О. А., Лазарева А. В., Чеботарь И. В., Бочарова Ю. А., Маянский Н. А. Спектр антибиотикорезистентности и распространенность OXA-карбапенемаз среди штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных у пациентов хирургических и реанимационных отделений в Москве. *Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии.* 2016; 1: 40–45. [Kryzhanovskaya O. A., Lazareva A. V., Chebotar I. V., Bocharova Yu. A., Mayansky N. A. Spectrum of antibiotic resistance and prevalence of OXA-carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* strains, isolated from patients of surgical and reanimation departments in Moscow. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, Immunobiologii.* 2016; 1: 40–45 (in Russian)]
60. Chan K. W., Liu C. Y., Wong H. Y., Chan W. C., Wong K. Y., Chen S. Specific Amino Acid Substitutions in OXA-51-Type β -Lactamase enhance catalytic activity to a level comparable to carbapenemase OXA-23 and OXA-24/40. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (9): 4496. doi: 10.3390/ijms23094496. PMID: 35562886; PMCID: PMC9105447.
61. Wang L., Chen Q. W., Qin Y. C., Yi X. L., Zeng H. Analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carbapenemase gene distribution and biofilm formation. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2024; 15 (1): 1–11. doi: 10.62347/KBSB9946.
62. Moussa S. H., Shapiro A. B., McLeod S. M., Iyer R., Carter N. M., Tsai Y.-K., Siu L. K., Miller A. A. Molecular drivers of resistance to sulbactam-durlobactam in contemporary clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2023; 15: 67 (11): e0066523. doi: 10.1128/aac.00665-23.
63. Findlay J., Poirel L., Bouvier M., Nordmann P. *In vitro* activity of sulbactam-durlobactam against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and mechanisms of resistance. *J Glob Antimicrob Resist.* 2022; 30: 445–450. doi: 10.1016/j.jgar.2022.05.011.
64. Tahbaz S. V., Azimi L., Lari A. R. Characterization of aminoglycoside resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* isolates from burn wound colonization. *Ann Burns Fire Disasters.* 2019; 32 (2): 115–121.
65. Rashvand P., Peymani A., Mohammadi M., Karami A. A., Samimi R., Hajian S. et al. Molecular survey of aminoglycoside-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from tertiary hospitals in Qazvin, Iran. *New Microbes New Infect.* 2021; 42: 100883. doi: 10.1016/j.nmni.2021.100883.
66. Ghasemi S., Shoja S., Mazloomirad E., Ghathe M. A., Rashidpoor F., Khorramrooz S. S. et al. Prevalence of aminoglycoside-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iran. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob.* 2022; 11 (1): 32–32. doi: 10.4274/mjima.galenos.2022.2021.32.
67. Jouybari M. A., Ahanjan M., Mirzaei B., Goli H. R. Role of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylase (ArmA) in resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates against aminoglycosides. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2021; 54: e05992020. doi: 10.1590/0037-8682-0599-2020.
68. Zárate S. G., De la Cruz Claire M. L., Benito-Arenas R., Revuelta J., Santana A. G., Bastida A. Overcoming aminoglycoside enzymatic resistance: design of novel antibiotics and inhibitors. *Molecules.* 2018; 23 (2): 284. doi: 10.3390/molecules23020284.
69. Nie L., Lv Y., Yuan M., Hu X., Nie T., Yang X. et al. Genetic basis of high level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* from Beijing, China. *Acta Pharm Sin B.* 2014; 4 (4): 295–300. doi: 10.1016/j.apsb.2014.06.004.
70. Ashouri P., Mohammadshahi J., Nikbin V. S., Peeridogaheh H., Mohammad-Ghalehbin B. et al. Antimicrobial resistance, integron carriage, and fluoroquinolone resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolates. *Arch Clin Infect Dis.* 2022; 17 (5): e120590. doi: <https://doi.org/10.5812/archcid-120590>.
71. Spencer A. C., Panda S. S. DNA Gyrase as a target for quinolones. *Bio-medicines.* 2023; 11 (2): 371. doi: 10.3390/biomedicines11020371.
72. Hooper D. C., Jacoby G. A. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016; 6 (9): a025320. doi: 10.1101/cshperspect.a025320.
73. Noskin G. A. Tigecycline: A new glycolcycline for treatment of serious infections. *Clinical Infectious Diseases.* 2005; 41 (5): S303–S314. doi: 10.1086/431672.
74. Sato Y., Ubagai T., Tansho-Nagakawa S., Yoshino Y., Ono Y. Effects of colistin and tigecycline on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilms: advantages and disadvantages of their combination. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 11700. doi: 10.1038/s41598-021-90732-3.
75. Pankuch G. A., Appelbaum P. C. Postantibiotic effect of tigecycline against 14 gram-positive organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (2): 782–784. doi: 10.1128/AAC.01122-08.
76. Yaghoubi S., Zekiy A. O., Krutova M., Gholami M., Kouhsari E., Sholeh M. et al. Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2022; 41 (7): 1003–1022. doi: 10.1007/s10096-020-04121-1.
77. Hua X., He J., Wang J., Zhang L., Zhang L., Xu Q. et al. Novel tigecycline resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* mediated by mutations in *adeS*, *rpoB* and *rrf*. *Emerg Microbes Infect.* 2021; 10 (1): 1404–1417. doi: 10.1080/22221751.2021.1948804.
78. Kornelsen V., Kumar A. Update on multidrug resistance efflux pumps in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021; 65 (7): e0051421. doi: 10.1128/AAC.00514-21.

79. Chen C., Cui C. Y., Yu J. J., He Q., Wu X. T., He Y. Z. et al. Genetic diversity and characteristics of high-level tetracycline resistance Tet (X) in *Acinetobacter* species. *Genome Med.* 2020; 12 (1): 111. doi: 10.1186/s13073-020-00807-5.
80. Ajiboye T. O., Skieba E., Wilharm G. Contributions of RecA and RecBCD DNA repair pathways to the oxidative stress response and sensitivity of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52 (5): 629–636. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.07.022.
81. Cheah S. E., Johnson M. D., Zhu Y., Tsuji B. T., Forrest A., Bulitta J. B. et al. Polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*: genetic mutations and transcriptomic changes in response to clinically relevant dosage regimens. *Sci Rep.* 2016; 6: 26233. doi: 10.1038/srep26233.
82. Mondal A. H., Khare K., Saxena P., Debnath P., Mukhopadhyay K., Yadav D. A Review on colistin resistance: an antibiotic of last resort. *Microorganisms.* 2024; 12 (4): 772. doi: 10.3390/microorganisms12040772.
83. Novović K., Jovčić B. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*: molecular mechanisms and epidemiology. *Antibiotics (Basel).* 2023; 12 (3): 516. doi: 10.3390/antibiotics12030516.
84. Hussein N. H., Al-Kadmy I. M. S., Taha B. M., Hussein J. D. Mobilized colistin resistance (mcr) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Mol Biol Rep.* 2021; 48 (3): 2897–2907. doi: 10.1007/s11033-021-06307-y.
85. Avila-Novoa M. G., Solís-Velázquez O. A., Rangel-López D. E., González-Gómez J. P., Guerrero-Medina P. J. et al. Biofilm formation and detection of fluoroquinolone- and carbapenem-resistant genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2019; 2019: 3454907. doi: 10.1155/2019/3454907.
86. Gedefie A., Demsis W., Ashagrie M., Kassa Y., Tesfaye M., Tilahun M. et al. *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: a review. *Infect Drug Resist.* 2021; 14: 3711–3719. doi: 10.2147/IDR.S332051.
87. Roy S., Chowdhury G., Mukhopadhyay A. K., Dutta S., Basu S. Convergence of biofilm formation and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infection. *Front Med (Lausanne).* 2022; 9: 793615. doi: 10.3389/fmed.2022.793615.
88. Choudhary M., Shrivastava R., Vashist J. *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: association with antimicrobial resistance and prolonged survival under desiccation. *Curr Microbiol.* 2022; 79: 361. doi: 10.1007/s00284-022-03071-5.
89. Mendes S. G., Combo S. I., Allain T., Domingues S., Buret A. G., Da Silva G. J. Co-regulation of biofilm formation and antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from mechanisms to therapeutic strategies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2023; 42 (12): 1405–1423. doi: 10.1007/s10096-023-04677-8.

Поступила / Received 09.10.2024
Принята в печать / Accepted 10.10.2024

Информация об авторах

Баранцевич Наталья Евгеньевна — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия. eLIBRARY: SPIN-код: 3914-4499. AuthorID: 785835. Scopus Author ID: 55880381000. ORCID ID: 0000-0002-1000-2240

Иванова Лариса Викторовна — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия. eLIBRARY: AuthorID: 934298

Баранцевич Елена Петровна — д. м. н., заведующая научно-исследовательским отделом микробиологии и внутрибольничных инфекций, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия. eLIBRARY: SPIN-код: 3534-1010. AuthorID: 268934. Scopus Author ID: 6601955793. WOS Research ID S-1455-2016. ORCID ID: 0000-0002-4800-3345

About the authors

Natalia E. Barantsevich — Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia. eLIBRARY: SPIN-code: 3914-4499. AuthorID: 785835. Scopus Author ID: 55880381000. ORCID ID: 0000-0002-1000-2240

Larisa V. Ivanova — Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia. eLIBRARY: SPIN-code: 934298

Elena P. Barantsevich — D. Sc. in Medicine, Head of the Research Department of Microbiology and Nosocomial Infections, Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia. eLIBRARY: SPIN-code: 3534-1010. AuthorID: 268934. Scopus Author ID: 6601955793. WOS Research ID S-1455-2016. ORCID ID: 0000-0002-4800-3345

Биоразнообразие и антимикробный потенциал ацидофильных и ацидотолерантных актиномицетов

А. В. ЧУМАК, *О. Н. СИНЁВА

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия

Резюме

Распространение антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов — одна из главных проблем современной медицины. В связи с особенностями метаболизма экстремофильных микроорганизмов, поиск продуцентов новых антимикробных соединений среди экстремофильных актиномицетов вполне обоснован. В обзоре рассмотрены ацидофильные и ацидотолерантные актиномицеты, которые являются неотъемлемой частью микробиомов кислых почв и, как показывают исследования, обладают высоким антимикробным потенциалом.

Ключевые слова: ацидофильные актиномицеты; биоразнообразие; антимикробный потенциал; вторичные метаболиты

Для цитирования: Чумак А. В., Синёва О. Н. Биоразнообразие и антимикробный потенциал ацидофильных и ацидотолерантных актиномицетов. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 101–109. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-101-109>. EDN: BVSMZU.

Biodiversity and Antimicrobial Potential of Acidophilic and Acidotolerant Actinomycetes

ANASTASIA V. CHUMAK, *OLGA N. SINEVA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

Abstract

The spread of antibiotic resistance in pathogenic microorganisms is one of the main problems of modern medicine. Given the unique metabolic properties of extremophilic microorganisms, the search for producers of new antimicrobial compounds among extremophilic actinomycetes is reasonably justified. The review examines acidophilic and acidotolerant actinomycetes, which are an integral part of the microbiomes of acidic soils and, as studies show, have high antimicrobial potential.

Keywords: acidophilic actinomycetes; biodiversity; antimicrobial potential; secondary metabolites

For citation: Chumak A. V., Sineva O. N. Biodiversity and antimicrobial potential of acidophilic and acidotolerant actinomycetes. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (11–12): 101–109. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-101-109>. EDN: BVSMZU. (in Russian)

Введение

Актиномицеты — грамположительные гетеротрофные бактерии, с высоким содержанием гуанин-цитозина в ДНК (51–70%), относящиеся к классу *Actinobacteria*, филуму Actinomycetota. *Actinobacteria* представляют собой одну из крупнейших таксономических единиц в домене Bacteria [1–3]. Большинство актиномицетов являются свободноживущими микроорганизмами и являются неотъемлемой частью микробиомов наземных и водных экосистем, также могут быть симбионтами человека, животных и растений, встречаются и патогенные формы. В биоценозах актиномицеты разлагают органические вещества, в том числе труд-

нодоступные, такие как лигнин и хитин. Одной из особенностей актиномицетов, привлекающей внимание исследователей, является способность к синтезу биологически активных соединений: антибиотиков, иммунодепрессантов, противоопухолевых соединений, антигельминтных средств, гербицидов и ферментов [4–9].

В настоящее время для поиска новых биологически активных соединений внимание исследователей направлено на изучение микроорганизмов, обитающих в экстремальных условиях, таких как пустыни, солёные озёра, горячие источники, кислые или щелочные почвы и др. В экстремальных условиях микроорганизмы подвер-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: olga.sineva81@yandex.ru



EDN: BVSMZU

*Correspondence to:
E-mail: olga.sineva81@yandex.ru



жены осмотическому стрессу, высокой концентрации солей, экстремальному уровню pH, сильной радиации, воздействию металлов и высокому давлению. Для выживания в таких условиях клетки должны обладать особыми механизмами регулирования внутриклеточных значений pH, состава растворённых веществ, биохимических реакций и производства других биомолекул, а также восстановления повреждённой ДНК. Вследствие существенного отличия метаболизма, экстремофилы синтезируют уникальные соединения, принадлежащие к различным классам и обладающие новой биологической активностью, эти метаболиты стабильно вырабатываются экстремофилами и могут быть источником новых препаратов, ценных для человека или животных [10, 11].

Экстремофилы классифицируются в зависимости от условий, в которых они растут: термофилы и гипертермофилы, психрофилы, ацидофилы и алкалофилы, барофилы, галофилы. Довольно часто эти организмы являются полиэкстремофилами, например, многие горячие источники являются кислыми или щелочными одновременно и обычно богаты металлами; глубоководный океан, как правило, холодный, олиготрофный, солёные озёра могут быть одновременно и щелочными. Экстремофилы могут быть разделены на две большие категории: экстремофильные организмы, которым для полноценного роста требуются экстремальные условия и экстремотолерантные организмы, которые могут переносить экстремальные условия, но оптимальный рост наблюдается при нормальных условиях [12].

Интерес к кислотоустойчивым актиномицетам возник очень давно. В 1914 г. Waksman исследовал рост штамма *Streptomyces scabies* в кислых условиях и установил предельный диапазон роста в пределах pH 4,8–5,2. В 1928 г. Jensen выделил штамм стрептомицета из кислых вересковых и лесных почв, который был отнесён к виду *Streptomyces acidophilus* и показал, что штамм не способен расти при pH выше 6,5. Продолжив изучение актиномицетов, живущих в кислотных почвах, установил, что они встречаются в них лишь в небольшом количестве. Однако дальнейшие исследования показали, что актиномицеты являются частью микробиомов кислых почв и способны расти при низких значениях pH, причём среди изолятов были представлены как ацидотолерантные (способные к росту при pH 5,5–8,5 с оптимумом при pH 7,0), так и ацидофильные актиномицеты (способные к росту при pH 3,5–6,5 с оптимумом при pH 4,5–5,5). Кроме того, было показано, что ацидофильные актиномицеты продуцируют экзоферменты (гидролазы, хитиназы) активность которых зависит от уровня pH. Большинство

выделенных кислотоустойчивых актиномицетов было отнесено к роду *Streptomyces* [13–18]. К настоящему времени описаны ацидофильные и ацидотолерантные актиномицеты родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Catenulispora Actinoallomurus*, *Actinospica*, *Kitasatospora*, *Nocardia*, *Streptacidiphilus* и др. [19–22]. На основании полифазного таксономического анализа для ацидофильных близкородственных роду *Streptomyces* актиномицетов было предложен новый род *Streptacidiphilus* и в последнем издании Bergey's manual of systematic Bacteriology (Volume Five, The Actinobacteria) ацидофильные актиномицеты, генетически близкородственные родам *Streptomyces* и *Kitasatospora*, способные к росту при pH от 3,5 до 6,0 с оптимумом при pH 5, имеющие небольшие различия в составе пептидогликана клеточной стенки, содержащие в гидролизатах большое количество галактозы и рамнозы и имеющие уникальные локусы 16S рРНК, отнесены к новому роду [23, 24].

Ацидофильные актиномицеты обладают антимикробной активностью в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий и грибов. Сравнительный анализ генома показал наличие биосинтетических кластеров, кодирующих синтез вторичных метаболитов, которые могут обладать широким спектром биологической активности. Таким образом, изучение данной группы актиномицетов является перспективным направлением в поиске новых антимикробных соединений, а также кислотоустойчивых ферментов.

Выделение ацидофильных и ацидотолерантных актиномицетов из почвы

Ацидофильные актиномицеты выделяют из кислых почв стандартным методом посева почвенных суспензий на плотные питательные среды, содержащие необходимые для роста данной группы микроорганизмов компоненты. Наиболее часто используют среды с крахмалом и/или казеином (состав указан в г/л): крахмально-казеиновая (крахмал — 10,0, казеин — 0,3, KNO₃ — 2,0, NaCl — 2,0, KH₂PO₄ — 2,0, MgSO₄×7H₂O — 0,05, CaCO₃ — 0,02, FeSO₄×7H₂O — 0,01, агар — 18), крахмал-казеин-нитратный агар (растворимый крахмал — 10,0, казеин без витаминов — 0,1, NaNO₃ — 2,0, NaCl — 2,0, K₂HPO₄ — 2,0, MgSO₄ — 0,05, CaCO₃ — 0,02, FeSO₄ — 0,01, агар — 15,0), минеральный агар 1 / Гаузе 1 (растворимый крахмал — 20,0, K₂HPO₄ — 0,5, MgSO₄ — 0,5, KNO₃ — 1,0, NaCl — 0,5, FeSO₄ — 0,01, агар — 30,0), казеин-глицериновый агар (казеинат натрия — 2,0, L-аргинин — 0,1, пропионат натрия — 4,0, K₂HPO₄ — 0,5, MgSO₄ — 0,1, FeSO₄ — 0,001, глицерин — 5,0, агар — 15,0) [14–16, 19, 20, 22, 25–39], также ис-

пользуют HV-агар [21, 38], агар с почвенным экстрактом [16, 27, 38, 40, 41], глицерин-аспарагиновый агар [42].

Так как pH большинства сред для актиномицетов находится в области 6,8–7,4, то для выделения и дальнейшего культивирования кислотолюбивых форм микроорганизмов среды подкисляют с помощью кислот (H_2SO_4 , HCl) [21, 36, 41], фосфатных буферов [18–22, 35, 40, 43, 44, 45] или добавляют H_2SO_4 / NaOH [21].

В связи с наличием в почвенных образцах немикелиальных бактерий и грибов, которые могут мешать выделению актиномицетов, в питательные среды добавляют антибиотики (налидиксовую кислоту, нистатин, кетоконазол, циклогексимид, новобиоцин, кабицидин, амоксициллин, амфотерицин В) или их комбинации [19, 21, 22, 27, 31, 34–36, 38, 40, 43, 44, 46, 47–54].

Кроме стандартного метода десятикратных разведений почвенных образцов в воде, физрастворе или растворе Рингера и высева аликвот на плотные питательные среды [19, 20, 30, 33, 49, 52] применяют метод дифференциального центрифугирования [43, 44, 55] и инкубацию почвенных суспензий при температуре 50–100°C, что способствует снижению численности немикелиальных бактерий и преимущественному выделению споровых актиномицетов [31, 35, 38, 42, 46, 50, 51, 56–58].

При выделении актиномицетов нужно учитывать, что потребности в источниках углерода, азота и микроэлементов могут существенно различаться не только между представителями разных родов, но и видов, поэтому для исследования биоразнообразия, а также выделения редких актиномицетов используют посев почвы на две или несколько питательных сред [19, 20, 27, 35, 49, 50, 51]. Количество выделенных актиномицетов, их таксономическое разнообразие зависят не только от используемой питательной среды и её кислотности, но и от типа почвы и предварительной обработки. Изучение распространения кислотолюбивых актиномицетов в разных почвах показало, что количество выделенных актиномицетов может существенно отличаться в зависимости от питательной среды: численность актиномицетов в серой лесной почве составляла 88×10^3 КОЕ/г при посеве на минеральном агаре Гаузе 1 и 310×10^3 КОЕ/г при посеве на глицерин-казеиновом агаре, также было показано, что использование подкисленной питательной среды позволяет увеличить долю кислотолюбивых актиномицетов, причём такая тенденция в большей степени проявлялась на кислых почвах (низинных болотных почвах, торфяно-подзолистых, бурых лесных и серых лесных почвах) и, в меньшей степени, на чернозёмах с pH близким к нейтральному. Кроме того, при выделении на казеин-глицериновом агаре с pH

5,3 выделились только актиномицеты рода *Micromonospora*, в отличие от минерального агара, где их доля составляла 73%, а доля стрептомицетов и актиномицетов редких родов 12 и 15%, соответственно. В чернозёме, напротив, преобладали стрептомицеты, и при выделении на минеральном агаре с pH 5,3 представители рода *Micromonospora* не были обнаружены [20].

В исследовании Yu. V. Zakalyukina и соавт. [53] также было установлено, что кислотолюбивые актиномицеты присутствуют в почвах, уровень pH которых не превышает 6,8 (кислые лесные почвы, низинные торфянистые почвы и обычный чернозём). Доминирующими актиномицетами в низинных торфянистых почвах были актиномицеты рода *Micromonospora*, а сравнение стрептомицетных комплексов чернозёма и низинных торфянистых почв выявило существенные различия. При выделении актиномицетов из слабокислых почв и растительной подстилки заповедника Pu Hoat Nature Reserve (Вьетнам) с использованием предварительной обработки образцов в диспергаторе (22 кГц, 0,44 А) и посеве на минеральный агар 1 (pH — 7,2–7,4) были выделены актиномицеты рода *Streptomyces* серии *Albus Albus*, *Cinereus Chromogenes*, *Cinereus Achromogenes*, *Helvolo-Flavus Helvolus*, *Helvolo-Flavus Flavus*, and *Roseus Lavandulae-roseus*, большинство штаммов обладало обильным ростом при pH 5,0.

Количество актиномицетов в образцах варьировало от $2,0 \times 10^4$ (горный хвойный лес) до $9,2 \times 10^6$ КОЕ/г (широколиственный лес, растущий в долине) [22]. Выделение актиномицетов из почв с разным pH (5,3–8,4) на не подкисленном крахмально-казеиновом агаре показало, что из кислых почв выделилось меньше изолятов, чем из нейтральных или слабощелочных, однако выделение на подкисленной среде в данном исследовании не проводилось [52]. Различия в количестве актиномицетов в образцах ризосферных почв при выделении на крахмально-казеиновом агаре и водном агаре с пролином, влияние предварительной обработки почвенных образцов сухим жаром показаны в исследованиях J. Euanorasetr и соавт. [50]. При выделении кислотолюбивых и кислотолюбивых актиномицетов стоит учитывать адаптационные способности микроорганизмов к естественным условиям среды, в данном случае способность к росту в определённом диапазоне pH, таким образом, в кислых почвах наряду с кислотолюбивыми присутствуют и нейтрофилы, а на нейтральной среде можно выделить кислотолюбивые микроорганизмы. Поэтому обоснованием для отнесения актиномицетов к той или иной группе служит определение pH для оптимального роста культуры, т.е. необходимо изучение радиальной скорости роста и культурально-морфологических характеристик [59].

Поддержание культур ацидофильных и ацидотолерантных актиномицетов и изучение их характеристик проводят на средах: Гаузе 1, ISP 2, ISP 3, среде Беннета, крахмально-казеиновом агаре и др., доводя pH среды до уровня, при котором наблюдается оптимальный рост актиномицета или в зависимости от цели эксперимента [23, 29, 30, 32, 36, 40, 43, 44, 48, 55, 58, 60–62].

Длительное хранение культур осуществляется в 20% (по объёму) глицерине в морозильной камере [23, 29, 32, 36, 43, 44, 48, 60, 61–63].

Биоразнообразие

Современные исследования показали, что ацидофильные и ацидотолерантные актиномицеты широко распространены в почвах. Конечно, представители этой группы актиномицетов ещё мало изучены по сравнению с нейтрофильными актиномицетами в связи с тем, что на протяжении многих лет актиномицеты выделяли из нейтральных почв и, соответственно, культивировали на средах с нейтральными pH. Возникший интерес к экстремофильным актиномицетам, в том числе ацидофильным, тесно связан с поиском новых антимикробных соединений, продуцентами которых могут быть актиномицеты из мало изученных экологических ниш.

Среди выделенных ацидофильных и ацидотолерантных актиномицетов доминирующими представителями являются стрептомицетоподобные актиномицеты, относящиеся к семейству Streptomycetaceae, которое до недавнего времени включало роды *Allostreptomyces* [64], *Kitasatospora* [65, 66], *Streptacidiphilus* [23] и *Streptomyces* [24]. В настоящее время пересмотрен родовой состав этого семейства: предложены два новых рода *Embleya* gen. nov. и *Yinghuangia* gen. nov, куда отнесены *Streptomyces scabrissporus* и *Streptomyces aomiensis*, соответственно, также ряд видов родов *Streptomyces* и *Streptacidiphilus* было предложено отнести к новым родам *Peterkaempferia* gen. nov (*Streptacidiphilus bronchialis*, *Streptomyces griseoplanus*), *Phaeacidiphilus* gen. nov (*Streptacidiphilus oryzae*), *Actinacidiphila* gen. nov (отнесено 12 видов рода *Streptomyces*), *Wenjunlia* gen. nov (*Streptomyces tyrosinilyticus*), *Mangrovactinospora* gen. nov (*Streptomyces gilvigriseus*), *Streptantibioticus* gen. nov (*Streptomyces cattleya*, *Streptomyces ferralitis*, *Streptomyces parmotremae*, *Streptomyces rubrisoli*) [62, 67].

Большое количество ацидофильных и ацидотолерантных видов семейства Streptomycetaceae относится к роду *Streptacidiphilus*, который на данный момент состоит из 14 валидированных видов (<https://lpsn.dsmz.de/genus/streptacidiphilus>). Это актиномицеты, способные жить в диапазоне pH 3,5–8,0 и с оптимумом роста при кислых значе-

ниях pH. Все штаммы, кроме *Streptacidiphilus fusans* выделены из почвенных образцов, собранных в разных регионах [23, 29, 36, 44, 60, 61, 68–71]. Актиномицеты рода *Streptomyces* являются неотъемлемой частью микробиомов кислых почв, в большинстве своём доминируют в сообществах и при выделении на плотных питательных средах, при этом не всегда оптимум роста стрептомицетов находится в области низких значений pH, таким образом, термин «ацидофильные» следует применять к актиномицетам, обладающим оптимумом роста при кислых значениях pH. Несмотря на то, что показана корреляция между оптимумом роста стрептомицетов и pH среды, на которой они были выделены, необходимо изучать такие характеристики, как радиальная скорость роста, морфология мицелия, образование пигментов [20, 22, 27, 51, 53, 59].

Следующие виды стрептомицетов, выделенные из кислых почв, способны расти при низких значениях pH: *Streptomyces guanduensis*, *Streptomyces paucisporeus*, *Streptomyces rubidus*, *Streptomyces yanglinensis*, *Streptomyces cocklensis*, но так как pH для оптимально роста не установлен, то данные стрептомицеты можно отнести к ацидотолерантным актиномицетам. Для видов *S. guanduensis*, *S. paucisporeus*, *S. rubidus*, *S. yanglinensis* авторами предложено название — нейтрофильные ацидофилы [43, 72]. Штаммы стрептомицетов: *Streptomyces oryziradicis*, способный расти в диапазоне pH 4,0–8,0 с оптимумом роста при pH 7,0, *S. yeochonensis* (pH 4,3–7,3), *Streptomyces acididurans* (pH 4,0–7,0, оптимум при pH 6) предложено отнести к новому роду *Actinacidiphila* [62, 67, 73, 74, 75]. Для видов *Streptomyces parmotremae* (pH 4,0–9,0, оптимум при pH 6), *Streptomyces rubrisoli* (pH 4,0–9,0, оптимум при pH 5) предложен новый род *Streptantibioticus*, куда входит новый ацидофильный вид *Streptantibioticus silvisoli* (pH 5,0–7,0, оптимум при pH 5,5–6,0) [48, 62, 76].

Из образцов почвы, собранных в природном заповеднике Pu Hoat Nature Reserve центрального Вьетнама, выделены 20 штаммов термотолерантных ацидофильных актиномицетов рода *Streptomyces* [22]. Описано 12 видов стрептомицетов, выделенных из образцов кислой ризосферной почвы, собранных на сельскохозяйственных участках в трёх провинциях Таиланда [50]. Также из ризосферной почвы риса и каучуковых деревьев, собранной в провинциях Таиланда на кислой среде (pH 5,5) выделены ацидофильные стрептомицеты видов *S. misionensis*, *S. chromofuscus*, *S. olivaceoviridis*, *S. spiralis*, *S. capoamus*, *S. thermoviolaceus* [35]. Из кислых почв Таиланда и листового опада на подкислённой среде HV-агар выделены 32 штамма ацидофильных стрептомицетов с оптимумом роста при pH 4–5, которые были отнесены к следующим видам: *S. mobaraensis*, *S. griseo-*

carneus, *S. ferralitis* (correct name *Streptantibioticus ferralitis* <https://lpsn.dsmz.de/genus/streptantibioticus>), *S. hebeiensis*, *S. aureofaciens* (correct name *Kitasatospora aureofaciens* <https://lpsn.dsmz.de/genus/kitasatospora>), *S. paucisporeus*, *S. spinoverrucosus*, *S. seoulensis*. Кроме того, в данном исследовании два штамма, отнесённые к *S. ferralitis* росли при разных диапазонах pH и имели разные оптимумы роста, что говорит о внутривидовых адаптациях.

Среди представителей семейства Streptomycetaceae в данном исследовании выделены ацидофильные актиномицеты рода *Streptacidiphilus*: *Streptacidiphilus oryzae*, *Streptacidiphilus jiangxiensis*, *Streptacidiphilus neutrinimicus*, *Kitasatospora sampliensis* [21]. В исследовании М. J. Kim и соавт. [33] описан новый вид *Kitasatospora acidiphila*, диапазон роста pH которого составлял 4–9, но оптимум был при pH 5. Из кислой ризосферной почвы выделен актиномицет *Kitasatospora viridis*, штамм способен расти в диапазоне pH 4–7 [77].

Род *Actinospica* состоит из четырёх ацидофильных видов актиномицетов: *A. robiniae*, *A. acidiphila*, *A. durhamensis*, *A. acidithermotolerans*, последний является термотолерантным [39, 41, 45]. Род *Actinocrinis* включает единственный ацидофильный вид *Actinocrinis puniceicyclus*, выделенный из образца почвы богатой оксидами железа, которая на момент отбора проб имела pH 3,3 [78]. Выделены почвенные ацидофильные и ацидотолерантные актиномицеты рода *Catenulispora*, семейства Catenulisporaceae: *C. yoronensis*, *C. subtropica*, *C. rubra*, *C. acidiphila*, *C. graminis*, *C. fulva*, *C. pinisilvae* [40, 47, 63, 79–81]. Из образцов кислой почвы выделены представители рода *Amycolatopsis*: *Amycolatopsis acidicola*, *Amycolatopsis acididurans*, *Amycolatopsis acidiphila*, *Amycolatopsis dongchuanensis*, *Amycolatopsis tolypomycina*, *Amycolatopsis dongchuanensis* [34, 35, 42, 46].

Однако впервые описанный штамм вида *Amycolatopsis dongchuanensis* sp. nov. характеризуется диапазоном роста pH 6–8, с оптимумом роста при pH 7–8 и, соответственно, не является ацидофильным, но выделенные в исследовании N. Roonthongdee и соавт. [35] штаммы, отнесённые к этому виду, были ацидофильными, что является примером внутривидовой адаптации [82]. Актиномицеты рода *Rugosimonospora*, семейства Micromonosporaceae: *Rugosimonospora acidiphila* и *Rugosimonospora africana*, выделенные из почвенных образцов, отобранных в северной Италии и Камеруна, соответственно, растут в диапазоне pH 4,5–7,2 с оптимумом роста pH 5–6 [57]. Исследования, направленные на изучение актиномицетных комплексов разных типов почв при выделении на питательных средах, отличающихся показателями pH, показали, что количество актиномицетов рода *Micromonospora* увеличивается при выделении из кислых почв на подкислённой

среде (pH 5,3) и они являются доминантным компонентом актиномицетного сообщества низинной торфяной почвы [19]. Из образцов кислых лесных почв (pH 3,69–4,06) выделены полиэкстремофильные актиномицеты рода *Thermoactinomyces*, с оптимумом роста при pH 5,0 и температуре 500С [83]. Описаны ацидофильные и ацидотолерантные актиномицеты родов: *Nocardia* (*N. aciditolerans*, *N. miyunensis*, *N. jiangxiensis*), *Actinoallomurus* (*A. purpureus*, *A. spadix*, *A. iriomotensis*), *Trebonia* (*T. kvetii*) с оптимумом роста при pH 5,0–6,0 [21, 54, 55, 84].

Антимикробный потенциал

Известно, что актиномицеты являются продуцентами большого количества антимикробных соединений, ацидофильные и ацидотолерантные актиномицеты также обладают способностью к синтезу биоактивных вторичных метаболитов. Для представителей этой группы актиномицетов показана антимикробная активность в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий и грибов [21, 22, 27, 33–35, 38, 49–52, 56, 79, 85–89]. Кроме того, ацидофильный штамм *Streptacidiphilus rugosus* является продуцентом новых трипептидов (ацидифиламидов А–Е) — ингибиторов клеточной аутофагии, которые могут быть рассмотрены как перспективные агенты для терапии опухолей [26].

В микробных сообществах кислых почв основными конкурентами актиномицетов являются грибы, так как пониженная кислотность почвы благоприятствует развитию последних [90]. В связи с чем, ряд исследований посвящён поиску продуцентов антифунгальных соединений среди ацидотолерантных и ацидофильных актиномицетов, которые могут найти применение в сельском хозяйстве для борьбы с фитопатогенными грибами. Так, сравнительная оценка антифунгальной активности ацидофильных и нейтрофильных штаммов стрептомицетов показала, что антифунгальная активность в отношении фитопатогенных грибов рода *Fusarium* (*F. solani*, *F. gibbosum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichiella*, *F. oxysporum*) у ацидофильных штаммов выше, чем у нейтрофилов [85]. Также показана антифунгальная активность в отношении и других фитопатогенных грибов: *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium oryzae* [35, 51]. Шестьдесят два из 71 штамма ацидотолерантных актиномицетов, выделенных из почвы соснового леса, проявляли антагонизм в отношении 19 фитопатогенных грибов родов *Phytophthora*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botritis*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Chalara*. Самые высокие уровни активности были зарегистрированы для *Streptomyces pinistramenti* SF28T, который подавлял рост 17 фитопатогенов [88]. Проведённые исследования антифун-

гальной активности ацидофильных штаммов актиномицетов выявили активность и в отношении патогенов человека и животных: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* [21, 89].

В геномах ацидофильных штаммов актиномицетов *Streptantibioticus silvisoli* были обнаружены кластеры генов, кодирующих таутомицин, полициклические тетрамастные макролактамы, термостабильный противогрибковый фактор, ингибирующие рост различных грибов, а также большое количество биосинтетических кластеров, практически не имеющих сходства с уже известными, что свидетельствует о потенциальном биосинтезе новых соединений [62]. В геноме *Streptacidiphilus oryzae* найдены гены, связанные с синтезом поликетидов II типа, терпеноидов и аминогликозидов [91].

Анализ геномов штаммов рода *Streptacidiphilus* показал, что наиболее распространёнными биосинтетическими кластерами (BGC) являются кластеры генов, отвечающие за синтез терпеноидов, макротетралидов и пара-терфениловых соединений, ингибиторов топоизомераз, которые рассматриваются как агенты для противоопухолевой терапии [28]. Сравнительный анализ BGC геномов ацидофильных актиномицетов рода *Actinospica* и близкородственных штаммов *Actinocrinis puniceicyclus* и *Catenulispora acidiphila* показал высокое сходство последовательностей генов с известными биокластерами, связанными с синтезом антимицина, касибииоцина, катенулипептина, курамицина, икосалидов A/B, остальные показали низкое сходство с известными соединениями. Геномы всех штаммов содержали биокластер, связанный с выработкой полиенового макролактама, который ингибирует рост трипаномы.

Были обнаружены и штамм-специфичные биокластеры, связанные с синтезом антибиотиков. В геноме *Actinospica acidiphila* B-2296 также обнаружены гены, кодирующие синтез антибиотиков алтиомицина и альбафлавенона [45, 92]. Геном *Streptomyces parmotrematis* содержит несколько BGC, включая терпены, поликетиды, лантипептиды, нерибосомальные пептиды [76]. В геноме *Streptomyces yeochonensis* обнаружено 22 BGC, из которых 15 показали сходство с известными биосинтетическими кластерами, для 7 кластеров не удалось найти сходства [93]. Анализ генома *Kitasatospora acidiphila* показал, что штамм содержит в общей сложности 30 кластеров биосинтетических генов, включая кластеры потенциальных антимикробных и противоопухолевых соединений, но в большинстве случаев сходство по составу с известными BGC было незначительным, следовательно, этот штамм может быть по-

тенциальным продуцентом новых антимикробных метаболитов [33]. Геномы ацидофильных актиномицетов рода *Catenulispora* также содержат большое количество BGC, в том числе кодирующие неизвестные соединения [79]. В геноме *Trebonia kvetii* были идентифицированы десять BGC, отвечающих за выработку вторичных метаболитов: два кластера бактериоцина, два — β -лактоны, индол, NRPS-подобные, резорцин, терпен, поликетиды I и III типов [84].

Ацидофильные актиномицеты являются перспективными объектами современной биотехнологии в области создания антимикробных препаратов на основе наночастиц серебра (AgNPs). Наночастицы серебра могут быть синтезированы физическими и химическими методами, однако биологический синтез является более экологичным. Как показывают исследования, ацидофильные актиномицеты родов *Streptacidiphilus*, *Streptomyces*, *Pilimelia* способны к биогенному синтезу AgNPs, штамм *Streptomyces* sp. NH21 способен синтезировать ещё и наночастицы золота. Синтезированные актиномицетами наночастицы серебра обладали антимикробной активностью в отношении ряда патогенов, кроме того был показан синергизм при совместном использовании AgNPs с антибиотиками [94–97].

Заключение

Как показывают исследования, к настоящему времени выделено большое количество ацидофильных и ацидотолерантных актиномицетов, относящихся к разным родам, в том числе к редким. Описаны новые роды, состоящие исключительно из ацидофильных представителей. Показано, что выделенные актиномицеты обладают широким спектром антимикробной активности. Исследования геномов также выявило большое количество биосинтетических кластеров, в том числе не имеющих сходства с уже известными BGC, что говорит о перспективности исследований в направлении поиска новых антимикробных метаболитов.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest related to the publication of this article.

Литература/References

- Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.-P. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016; 80 (1): 1–43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15.
- Ludwig W., Euzéby J., Schumann P., Buss H.-J., Trujillo M. E., Kämpfer P. et al. Road map of the phylum *Actinobacteria*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, NY. 2012; 1–28. doi: 10.1007/978-0-387-68233-4_1.
- Oren A., Garrity G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2021; 71 (10). doi: 10.1099/ijsem.0.005056.
- Tiwari K., Gupta R. K. Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Crit Rev Microbiol*. 2013; 39 (3): 256–294. doi: 10.3109/1040841X.2012.709819.
- Щекотихин А. Е., Олсуфьева Е. Н., Янковская В. С. Антибиотики и родственные соединения. М.: Лаборатория знаний. 2022. [Shchekotikhin A. E., Olsufieva E. N., Yankovskaya V. S. Antibiotiki i Roststvennyye Soedineniya. Moscow: Laboratoriya Znanij. 2022. (in Russian)]
- Hutchings M. L., Truman A. W., Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019; 51: 72–80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- Aminov R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010. 1: 1–7. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012; 65 (8): 385–395. doi: 10.1038/ja.2012.27.
- Grasso L. L., Martino D. C., Alduina R. Production of antibacterial compounds from *Actinomycetes*. In *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. 2016; 214 (11): 272–282. doi: https://doi.org/10.5772/61525.
- Giddings L.-A. and Neuman D. J. Bioactive compounds from terrestrial extremophiles. *Extremophilic Bacteria*. 2015; 1–75. doi: 10.1007/978-3-319-13260-0.
- Shivlata L., Satyanarayana T. Thermophilic and alkaliphilic *Actinobacteria*: biology and potential applications. *Front Microbiol*. 2015; 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01014.
- Rampelotto P. H. Extremophiles and extreme environments. *Life*. 2013; 3: 482–485. doi: 10.3390/life3030482.
- Corke C. T., Chase F. E. Comparative studies of *Actinomycete* populations in acid podzolic and neutral mull forest soils. *Soil Science Society of America Journal*. 1964; 28: 68–70. doi: 10.2136/sssaj1964.03615995002800010034x.
- Davies F. L., Williams S. T. Studies on the ecology of *Actinomycetes* in soils I. The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biology Biochemistry*. 1970; 2: 227–238. doi: /10.1016/0038-0717 (70)90029-5.
- Williams S. T., Davies F. L., Mayfield C. I., Khan M. R. Studies on the ecology of *Actinomycetes* in soils II. The pH requirements of *Streptomyces* from two acid soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1971; 3: 187–195. doi: 10.1016/0038-0717 (71)90014-9.
- Khan M. R., Williams S. T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil — VIII: Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. *Soil Biology and Biochemistry*. 1975; 7: 345–349. doi: 10.1016/0038-0717 (75)90047-4.
- Williams S. T., Flowers T. H. The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic streptomycetes. *Microbios*. 1978; 20 (80): 99–106.
- Williams S. T., Robinson C. S. The role of streptomycetes in decomposition of chitin in acidic soils. *Journal of General Microbiology*. 1981; 127: 55–63. doi: 10.1099/00221287-127-1-55.
- Зенова Г. М., Закалюкина Ю. В., Селянин В. В., Звягинцев Д. Г. Выделение и рост почвенных кислотофильных актиномицетов рода *Micromonospora*. *Почвоведение*. 2004; 7: 874–852. [Zenova G. M., Zakalyukina Yu. V., Selyanin V. V., Zvyaginцев D. G. Vydeleniye i rost pochvennykh acidofil'nykh aktinomycetov roda *Micromonospora*. *Pochvovedeniye*. 2004; 7: 874–852. (in Russian)]
- Zenova G. M., Zakalyukina Yu. V., Zvyaginцев D. G. Acidotolerant actinomycetes in soils. *Eurasian Soil Science*. 2000; 33 (9): 975–977.
- Muramatsu H., Murakami R., Ibrahim Z. H., Murakami K., Shahab N., Nagai K. Phylogenetic diversity of acidophilic actinomycetes from Malaysia. *J Antibiot (Tokyo)*. 2011; 64: 621–624. doi: 10.1038/ja.2011.57. Epub 2011 Jul 27.
- Dorchenkova Yu. A., Gracheva T. A., Lysak L. V. Characteristics of the complexes of actinomycetes in the Pu Hoat Nature Reserve. *Eurasian Soil Science*. 2022; 55 (4): 485–489. doi: 10.1134/S106422932204007X.
- Kim S. B., Lonsdale J., Seong C.-N., Goodfellow M. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943) AL) emend. Rainey et al. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2003; 83: 107–116. doi: 10.1023/a: 1023397724023.
- Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M. E., Suzuki K., Ludwig W. et al. editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Volume 5: The Actinobacteria. 2012.
- Закалюкина Ю. В., Зенова Г. М. Антагонистические свойства почвенных кислотофильных актиномицетов. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2007; 4: 402–405. [Zakalyukina Yu. V., Zenova G. M. Antagonisticheskie svoystva pochvennykh acidofil'nykh aktinomycetov. *Izvestiya Rossijskoj akademii nauk. Seriya biologicheskaya*. 2007; 4: 402–405. (in Russian)]
- Hwang S., Yun Y., Won Hoon Choi W. H., Kim S. B., Shin J., Lee M. J., et al. Acidiphilamides A–E, modified peptides as autophagy inhibitors from an acidophilic actinobacterium, *Streptacidiphilus rugosus*. *J Nat Prod*. 2019; 82 (2): 341–348. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00828.
- Eftekhariwash L., Hamed J., Zarrini Gh., Bakhtiari R. Acidophilic and acid tolerant actinobacteria as new sources of antimicrobial agents against *Helicobacter pylori*. *Arch Razi Inst*. 2021; 76 (2): 261–272. doi: 10.22092/ari.2019.128039.1401.
- Malik A., Kim Y. R., Kim S. B. Genome mining of the genus *Streptacidiphilus* for biosynthetic and biodegradation potential. *Genes (Basel)*. 2020; 11 (10): 1166. doi: 10.3390/genes11101166.
- Golinska P., Kim B.-Y., Dahm H., Goodfellow M. *Streptacidiphilus hamsterleyensis* sp. nov., isolated from a spruce forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013; 104: 965–972. doi: 10.1007/s10482-013-0015-1.
- Zakalyukina Yu. V., Zenova G. M., Zvyaginцев D. G. Peculiarities of growth and morphological differentiation of acidophilic and neutrophilic soil streptomycetes. *Microbiology*. 2004; 73 (1): 89–93. doi: https://doi.org/10.1023/B: MICL.0000016372.52239.dd.
- Cho S.-H., Han J.-H., Seong C. N., Kim S. B. Phylogenetic diversity of acidophilic sporoactinobacteria isolated from various soils. *J Microbiol*. 2006; 44 (6): 600–606.
- Nion I., Osada M., Yamamura T., Muramatsu R. Acidophilic and acid-tolerant actinomycetes in an acid tea field soil. *Journal of General and Applied Microbiology*. 1995; 41: 175–180. doi: 10.22092/ari.2019.128039.1401.
- Kim M. J., Roh S. G., Kim M.-K., Park Ch., Kim S., Kim S. B. *Kitasatospora acidiphila* sp. nov., isolated from pine grove soil, exhibiting antimicrobial potential. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020; 70 (10). doi: 10.1099/ijsem.0.004450.
- Oyuntsetseg B., Cho S.-H., Jeon S. J., Lee H. B., Shin K.-S., Kim In.-S., et al. *Amycolatopsis acidiphila* sp. nov., a moderately acidophilic species isolated from coal mine soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017; 67 (9): 3387–3392. doi: 10.1099/ijsem.0.002126.
- Poomthongdee N., Duangmal K., Pathom-aree W. Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: diversity and properties beneficial to plants. *J Antibiot (Tokyo)*. 2015; 68: 106–114. doi: 10.1038/ja.2014.117.
- Golinska P., Ahmed L., Wang D., Goodfellow M. *Streptacidiphilus durhamensis* sp. nov., isolated from a spruce forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013; 104: 199–206. doi: 10.1007/s10482-013-9938-9.
- Гаузе Г. Ф., Преображенская М. А., Терехова Л. П., Максимова Т. С. Определитель актиномицетов. М.: Наука; 1983. [Gauze G. F., Preobrazhenskaya T. P., Sveshnikova M. L., Terekhova L. P., Maksimova T. S. *Opredelitel' aktinomycetov*. Moscow: Nauka; 1983. (in Russian)]
- Niyasom C., Boonmak S., Meesri N. Antimicrobial activity of acidophilic actinomycetes isolated from acidic soil. *KMITL Science and Technology Journal*. 2015; 15 (2): 62–69.
- Golinska P., Zucchi T. D., Silva L., Dahm H., Goodfellow M. *Actinospica durhamensis* sp. nov., isolated from a spruce forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015; 108: 435–442. doi: 10.1007/s10482-015-0496-1.
- Busti E., Cavaletti L., Monciardini P., Schumann P., Rohde M., Sosio M. et al. *Catenulispora acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel, mycelium-forming actinomycete, and proposal of *Catenulisporaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006; 56 (8): 1741–1746. doi: 10.1099/ijms.0.63858-0.
- Cavaletti L., Monciardini P., Schumann P., Rohde M., Bamonte R., Busti E., Sosio M. et al. *Actinospica robiniae* gen. nov., sp. nov. and *Actinospica acidiphila* sp. nov.: proposal for *Actinospicaceae* fam. nov. and *Catenulisporinae* subord. nov. in the order Actinomycetales. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006; 56 (8): 1747–1753. doi: 10.1099/ijms.0.63859-0.
- Teo W. F. A., Lipun K., Nantana Srisuk N., Duangmal K. *Amycolatopsis acididurans* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil in Thailand. *J Antibiot (Tokyo)*. 2021; 74: 199–205. doi: 10.1038/s41429-020-00382-2.
- Xu C., Wang L., Cui Q., Huang Y., Liu Z., Zheng G., Goodfellow M. Neutrotolerant acidophilic *Streptomyces* species isolated from acidic soils in China: *Streptomyces guanduensis* sp. nov., *Streptomyces paucisporeus* sp. nov., *Streptomyces rubidus* sp. nov. and *Streptomyces yanglinensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006; 56: 1109–1115. doi: 10.1099/ijms.0.63959-0.

44. Huang Y, Qingfeng Cui Q, Wang L, Carlos Rodriguez C, Quintana E, Goodfellow M, et al. *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in China. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2004; 86: 159–165. doi: 10.1023/B: ANTO.0000036124.18820.ae.
45. Kusuma A. B., Putra K. E., Vanggy L. R., Loh J., Imen Nouioui I., Goodfellow M. *Actinospica acidithermotolerans* sp. nov., a novel actinomycete isolated from sediment from an Indonesian hot spring. *Arch Microbiol*. 2022; 204 (518). doi: 10.1007/s00203-022-03058-7.
46. Teo W. F. A., Srisuk N., Duangmal K. *Amycolatopsis acidicola* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020; 70 (3): 1547–1554. doi: 10.1099/ijsem.0.003933.
47. Tamura T., Ishida Y., Otagoro M., Suzuki K. *Catenulispora subtropica* sp. nov. and *Catenulispora yoronensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58 (7): 1552–1555. doi: 10.1099/ijms.0.65561-0.
48. Guo X., Zhang L., Li X., Gao Y., Ruan J., Huang Y. *Streptomyces rubrisoli* sp. nov., neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from red soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015; 65 (9): 3103–3108. doi: 10.1099/ijms.0.000383.
49. Numan M., Saleem M., Nawaz S., Nosheen S., Sajid I. Acidophilic Actinobacteria: isolation, taxonomic characterization and bioactivity against multidrug resistant pathogens. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*. 2022; 20 (1). doi: 10.57239/PJLSS-2022-20.1.0013.
50. Euanorasetr J., Chotboonprasit V., Ngoennamchok W., Thongprathueang S., Promprateep A., Taweegasa S. et al. Isolation and characterization of aerobic actinomycetes with probiotic properties in Nile tilapia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2020; 10 (9): 40–49. doi: 10.7324/JAPS.2020.10905.
51. Veyisoglu A., Tatar D. Screening of acidophilic actinobacteria that show activity against paddy pest fungi. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*. 2021; 5 (3): 425–432. doi: 10.31015/ijaefs.2021.3.22.
52. Budhathoki S., Shrestha A. Screening of actinomycetes from soil for antibacterial activity. *Nepal Journal of Biotechnology*. 2020; 8 (3): 102–110. doi: 10.3126/njb.v8i3.33664.
53. Zakalyukina Yu. V., Zenova G. M., Zvyagintsev D. G. Acidophilic soil actinomycetes. *Microbiology*. 2002; 71 (3): 342–345. doi: 10.1023/A: 1015819131117.
54. Golinska P., Wang D., Goodfellow M. *Nocardia aciditolerans* sp. nov., isolated from a spruce forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013; 103: 1079–1088. doi: 10.1007/s10482-013-9887-3.
55. Cui Q., Wang L., Ying Huang Y., Liu Z., Goodfellow M. *Nocardia jiangxiensis* sp. nov. and *Nocardia miyunensis* sp. nov., isolated from acidic soils. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005; 55: 1921–1925. doi: 10.1099/ijms.0.63644-0.
56. George M., Anjumol A., George G., Hatha A. A. M. Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *African Journal of Microbiology Research*. 2012; 6 (10): 2265–2271. doi: <https://doi.org/10.5897/AJMR11.856>.
57. Monciardini P., Cavaletti L., Ranghetti A., Schumann P., Rohde M., Bamonte R., et al. Novel members of the family *Micromonosporaceae*, *Rugosimonospora acidiphila* gen. nov., sp. nov. and *Rugosimonospora africana* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009; 59 (11): 2752–2758. doi: 10.1099/ijms.0.010231-0.
58. Soledad M., Gurovic V., Muller S., Nicole Domin N., Seccareccia I., Nietzsche S., et al. *Micromonospora schwarzwaldensis* sp. nov., a producer of telomycin, isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013; 63 (10): 3812–3817. doi: 10.1099/ijms.0.051623-0.
59. Zenova G. M., Manucharova N. A., Zvyagintsev D. G. Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Eurasian Soil Science*. 2011; 44 (4): 417–436. doi: 10.1134/S1064229311040132.
60. Cho S.-H., Han J.-H., Ko H.-Y., Kim S. B. *Streptacidiphilus anmyonensis* sp. nov., *Streptacidiphilus rugosus* sp. nov. and *Streptacidiphilus melanogenes* sp. nov., acidophilic actinobacteria isolated from Pinus soils. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58 (7): 1566–1570. doi: 10.1099/ijms.0.65480-0.
61. Roh S. G., Kim M.-K., Park S., Yun B.-R., Park J., Kim M. J., et al. *Streptacidiphilus pinicola* sp. nov., isolated from pine grove soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68 (9): 3149–3155. doi: 10.1099/ijsem.0.002957.
62. Swiecimska M., Golinska P., Sangal V., Wachnowicz B., Goodfellow M. *Streptantibioticus silvisoli* sp. nov., acidotolerant actinomycetes from pine litter, reclassification of *Streptomyces cocklensis*, *Streptomyces ferralitis*, *Streptomyces parmotrematis* and *Streptomyces rubrisoli* as *Actinacidiphila cocklensis* comb. nov., *Streptantibioticus ferralitis* comb. nov., *Streptantibioticus parmotrematis* comb. nov. and *Streptantibioticus rubrisoli* comb. nov., and emended descriptions of the genus *Streptantibioticus*, the family *Streptomycetaceae* and *Streptomyces iconiensis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2023; 73 (7). doi: 10.1099/ijsem.0.005978.
63. Lee H.-J., Han S.-I., Whang K.-S. *Catenulispora graminis* sp. nov., a rhizobacterium from bamboo (*Phyllostachys nigro* var. *henonis*) rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012; 62 (11): 2589–2592. doi: 10.1099/ijms.0.035501-0.
64. Huang M.-J., Rao M. P. N., Salam N., Xiao M., Huang H.-Q., Li W.-J. *Allostreptomyces psammosileneae* gen. nov., sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the roots of *Psammosilene tunicoides* and emended description of the family *Streptomycetaceae* [Waksman and Henrici (1943)AL] emend. Rainey et al. 1997, emend. Kim et al. 2003, emend. Zhi et al. 2009. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017; 67 (2): 288–293. doi: 10.1099/ijsem.0.001617.
65. Omura S., Takahashi Y., Iwai Y., Tanaka H. *Kitasatosporia*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *J Antibiot*. 1982; 35: 1013–1019. doi: 10.7164/antibiotics.35.1013.
66. Zhang Z., Wang Y., Ruan J. A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). *Int J Syst Bacteriol*. 1997; 47: 1048–1054. doi: 10.1099/00207713-47-4-1048.
67. Madhaiyan M., Saravanan V. S., See-Too W.-S., Volpiano C. G., Sant'Anna F. H., da Mota F. F. et al. Genomic and phylogenomic insights into the family *Streptomycetaceae* lead to the proposal of six novel genera. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2022; 72 (10). doi: 10.1099/ijsem.0.005570.
68. Yu B., Han C., Zhao J., Zhang Y., Shan Q., Wu Y., et al. *Streptacidiphilus fuscans* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the root of pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021; 71 (6). doi: 10.1099/ijsem.0.004824.
69. Song W., Duan L., Jin L., Zhao J., Jiang S., Sun T. et al. *Streptacidiphilus monticola* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68: 1757–1761. doi: 10.1099/ijsem.0.002751.
70. Wang L., Huang Y., Liu Z., Goodfellow M., Rodriguez C. *Streptacidiphilus oryzae* sp. nov., an actinomycetes isolated from rice-field soil in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006; 56: 1257–1261. doi: 10.1099/ijms.0.64165-0.
71. Golinska P., Dahm H., Goodfellow M. *Streptacidiphilus toruniensis* sp. nov., isolated from a pine forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2016; 109: 1583–1591. doi: 10.1007/s10482-016-0759-5.
72. Kim B.-Y., Zucchi T. D., Fiedler H.-P., Goodfellow M. *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycin producing actinomycetes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012; 62: 279–283. doi: 10.1099/ijms.0.029983-0.
73. Li C., Cao P., Jiang M., Sun T., Shen Y., Xiang W., et al. *Streptomyces oryziradicis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of rice (*Oryza sativa* L.). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020; 70: 465–472. doi: 10.1099/ijsem.0.003777.
74. Kim S. B., Seong C. N., Jeon S. J., Bae K. S., Goodfellow M. Taxonomic study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54: 211–214. doi: 10.1099/ijms.0.02519-0.
75. Chantavorakit T., Klaysubun C., Duangmal K. *Streptomyces acididurans* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021; 71 (7). doi: 10.1099/ijsem.0.004849.
76. Somphong A., Poengsungnoen V., Buaruang K., Suriyachadkun C., Sripreechakap P., Tanasupawat S., Phongsopitanun W. Diversity of the culturable lichen-derived *Actinobacteria* and the taxonomy of *Streptomyces parmotrematis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2022; 115: 911–920. doi: 10.1007/s10482-022-01744-6.
77. Liu Z., Rodriguez C., Wang L., Qingfeng Cui Q., Huang Y., Quintana E. T. et al. *Kitasatospora viridis* sp. nov., a novel actinomycete from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005; 55: 707–711. doi: 10.1099/ijms.0.63329-0.
78. Kim J.-J., Marjerrison C. E., Shartau S. L. C., Brady A. L., Sharp C. E., Rijpstra W. I. C., et al. Actinocrinis puniceicyclus gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from an acidic spring. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017; 67: 602–609. doi: 10.1099/ijsem.0.001667.
79. Swiecimska M., Golinska P., Wypija M., Goodfellow M. Genomic-based classification of *Catenulispora pinisilvae* sp. nov., novella ctenobacteria isolated from a pine forest soil in Poland and emended description of *Catenulispora rubra*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2021; 44 (1): 126164. doi: 10.1016/j.syapm.2020.126164.
80. Tamura T., Ishida Y., Sakane T., Suzuki K.-I. *Catenulispora rubra* sp. nov., an acidophilic actinomycete isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007; 57 (10): 2272–2274. doi: 10.1099/ijms.0.65056-0.
81. Lee H.-J., Whang K.-S. *Catenulispora fulva* sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016; 66 (1): 271–275. doi: 10.1099/ijsem.0.000711.
82. Nie G.-X., Ming H., Li S., Zhou E.-M., Cheng J., Tang X. et al. *Amycolatopsis dongchuanensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012; 62: 2650–2656. doi: 10.1099/ijms.0.038125-0.
83. Yallop C. A., Edwards C., Williams S. T. Isolation and growth physiology of novel thermoactinomycetes. *J Appl Microbiol*. 1997; 83: 685–692. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00282.x.
84. Rapoport D., Sagova-Mareckova M., Sedlacek I., Provaznik J., Kralova S., Pavlinic D., et al. *Trebonia kvetii* gen. nov., sp. nov., an acidophilic actinobacterium, and proposal of the new actinobacterial family *Treboniaceae*

- fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020; 70: 5106–5114. doi: 10.1099/ijsem.0.004388.
85. Zakalyukina Yu. V., Zenova G. M. Antagonistic Activity of soil acidophilic actinomycetes. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 2007; 4: 402–405.
 86. Busti E., Monciardini P., Cavaletti L., Bamonte R., Lazzarini A., Sosio M. et al. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology.* 2006; 152: 675–683. doi: 10.1099/mic.0.28335-0.
 87. Elham B., Seveda H. Antagonistic activity of actinomycetes isolated from Azerbaijan's soils. *J Eco Heal Env.* 2016. 4 (3): 111–114. doi: 10.18576/jehel/040302.
 88. Swiecimska M., Golinska P., Goodfellow M. Generation of a high quality library of bioactive filamentous actinomycetes from extreme biomes using a culture-based bioprospecting strategy. *Front Microbiol.* 2023; 13: 1054384. doi: 10.3389/fmicb.2022.1054384.
 89. Basilio A., Gonzalez I., Vicente M. F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonzalez A., et al. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol.* 2003; 95: 814–823. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02049.x.
 90. Rousk J., Brookes P. C., Baath E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75 (6): 1589–1596. doi: 10.1128/AEM.02775-08.
 91. Kim Y. R., Park S., Kim T.-S., Kim M.-K., Han J.-H., Joung Y. et al. Draft genome sequence of *Streptacidiphilus oryzae* TH49T, an acidophilic actinobacterium isolated from soil. *Genome Announc.* 2015; 3 (3): e00703–15. doi: 10.1128/genomeA.00703-15.
 92. Majer H. M., Ehrlich R. L., Ahmed A., Earl J. P., Ehrlich G. D., Beld J. Whole genome sequencing of *Streptomyces actuosus* ISP-5337, *Streptomyces siyoaensis* B-5408, and *Actinospica acidiphila* B-2296 reveals secondary metabolomes with antibiotic potential. *Biotechnol Rep (Amst).* 2021; 29 e00596. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00596.
 93. Malik A., Kim Y. R., Jang I.H., Hwang S., Oh D.-C., Kim S. B. Genome-based analysis for the bioactive potential of *Streptomyces yeochonensis* CN732, an acidophilic filamentous soil actinobacterium. *BMC Genomics.* 2020; 21 (1): 118. doi: 10.1186/s12864-020-6468-5.
 94. Buszewski B., Railean-Plugaru V., Pomastowski P., Rafinska K., Szultka-Mlynska M., Golinska P. et al. Antimicrobial activity of biosilver nanoparticles produced by a novel *Streptacidiphilus durhamensis* strain. *J Microbiol Immunol Infect.* 2018; 51 (1): 45–54. doi: 10.1016/j.jmii.2016.03.002.
 95. Skladanowski M., Wypij M., Laskowski D., Golin'ska P. Dahm H., Rai M. Silver and gold nanoparticles synthesized from *Streptomyces* sp. isolated from acid forest soil with special reference to its antibacterial activity against pathogens. *J Clust Sci.* 2017; 28: 59–79. doi: 10.1007/s10876-016-1043-6.
 96. Railean-Plugaru V., Pomastowski P., Wypij M., Szultka-Mlynska M., Rafinska K., Golinska P. et al. Study of silver nanoparticles synthesized by acidophilic strain of Actinobacteria isolated from the of *Picea sitchensis* forest soil. *J Appl Microbiol.* 2016; 120 (5): 1250–1263. doi: 10.1111/jam.13093.
 97. Golinska P., Wypij M., Rathod D., Tikar S., Dahm H., Rai M. Synthesis of silver nanoparticles from two acidophilic strains of *Pilimelia columellifera* subsp. pallida and their antibacterial activities. *J Basic Microbiol.* 2016; 56: 541–556. doi: 10.1002/jobm.201500516.

Поступила / Received 13.08.2024

Принята в печать / Accepted 15.09.2024

Информация об авторах

Чумак Анастасия Владимировна — аспирант, инженер лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0009-0001-6715-8166

Синёва Ольга Николаевна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-0063-4922

About the authors

Anastasia V. Chumak — graduate student, engineer at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0009-0001-6715-8166

Olga N. Sineva — Ph. D. in Biology, Researcher at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-0063-4922

Анализ структуры возбудителей инвазивных микозов и развития их устойчивости к противогрибковым препаратам

*А. В. АВТОНОМОВА, Л. М. КРАСНОПОЛЬСКАЯ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия

Резюме

В последние десятилетия возросло количество случаев инвазивных микозов, в том числе из-за увеличивающегося числа иммунокомпрометированных пациентов. Основными возбудителями инвазивных микозов являются патогенные грибы из родов *Candida* и *Aspergillus*. Участились случаи микозов, вызываемых представителями порядка Mucorales, рода *Fusarium*. В 2022 г. ВОЗ впервые опубликовала ранжированный перечень грибковых патогенов, опасных для здоровья человека, в том числе вызывающих инвазивные микозы. Наибольшую долю возбудителей инвазивных микозов, возникающих в отделениях реанимации и интенсивной терапии, занимают представители рода *Candida*. Частота встречаемости *Candida albicans*, как возбудителя, постепенно снижается с 70–80%, выявляемых в конце 20 века, до 40–60% в последние годы. Доля кандидозов, вызываемых *Nakaseomyces glabratus* и *Candida parapsilosis*, напротив, растет. Для лечения инвазивных микозов используют ограниченное число лекарственных препаратов из групп полиенов, азолов, эхинокандинов и фторпиримидинов (флуцитозин). Число устойчивых к антимикотикам штаммов патогенных грибов постоянно растёт во всем мире. Основными факторами устойчивости к антимикотикам у грибов является внутренняя резистентность вида, а также длительный приём противогрибковых препаратов. Ко всем используемым противогрибковым препаратам выявлены устойчивые/низко чувствительные изоляты патогенов и установлены механизмы резистентности. Стратегия борьбы с проблемой увеличения случаев инвазивных микозов должна включать оптимизацию протоколов лечения существующими лекарственными препаратами, фундаментальные исследования механизмов устойчивости патогенных грибов к лекарственным препаратам, разработку путей преодоления резистентности, в том числе с помощью поиска новых антимикотиков.

Ключевые слова: микозы; инвазивные микозы; антимикотики; противогрибковые препараты; резистентность

Для цитирования: Автономова А. В., Краснополяская Л. М. Анализ структуры возбудителей инвазивных микозов и развития их устойчивости к противогрибковым препаратам. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 110–120. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-110-120>. EDN: TXCJVE.

Structure of Pathogens Causing Invasive Mycoses and the Development of Their Resistance to Antifungal Drugs

*ANASTASIA V. AVTONOMOVA, LARISA M. KRASNOPOLSKAYA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

Abstract

During the last decades, the number of cases of invasive mycoses has risen dramatically, and one of the reasons for that is the rise in the number of immunocompromised patients. The main causative agents of invasive mycoses are the pathogenic fungi from *Candida* and *Aspergillus* genera. The cases of invasive mycoses caused by the fungi from Mucorales order, *Fusarium* genus (sometimes from other taxa) also became more frequent. In 2022, WHO published for the first time a ranked list of fungal pathogens dangerous to human health, including the ones causing invasive mycoses. The most cases of invasive mycoses in intensive care units are caused by the causative agents from the *Candida* genus. The frequency of detection of *Candida albicans* as a causative agent has decreased from 70–80% in the end of 20th century to 40–60% in recent years. In contrast, the number of candidiasis caused by *Nakaseomyces glabratus* and *Candida parapsilosis* is growing. A limited number of drugs for systemic use from the polyenes, azoles, echinocandins, and flucytosine groups are used for treatment of invasive mycoses. The number of cultures resistant to antimycotics is increasing worldwide. The main factors of resistance to antimycotics among fungi are the general resistance of the species and long-term usage of such medications. Resistant or low-sensitive isolates of pathogenic fungi and the mechanisms of resistance have been identified for all used antimycotics. The strategy to overcome the problem of increasing cases of invasive mycoses should include the optimisation of treatment protocols for the invasive mycoses, the fundamental research of the mechanisms of resistance of pathogenic fungi, and the development of ways to overcome the resistance, including the search for the new antimycotics.

Keywords: mycoses; invasive mycoses; antimycotics; antifungal drugs; resistance

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



*Correspondence to:
E-mail: nomova@yandex.ru



EDN: TXCJVE

For citation: Avtomova A. V., Krasnopol'skaya L. M. Structure of pathogens causing invasive mycoses and the development of their resistance to antifungal drugs. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (11–12): 110–120. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-110-120>. EDN: TXCJVE. (in Russian)

Введение

Микозы — заболевания, вызываемые микроскопическими грибами, приобрели большое клиническое значение в последние тридцать лет. От тяжёлых и хронических форм микозов во всём мире страдают более 300 млн человек. Ежегодно в мире микроскопические грибы становятся причиной 1,3 млн смертей [1, 2].

Различные виды микозов традиционно делят на поверхностные (дерматомикозы), подкожные (эумицетомы) и системные (глубокие, инвазивные). Наибольшую обеспокоенность у специалистов вызывает возрастающее количество инвазивных микозов.

Несмотря на то, что микозы, в отличие от бактериальных и вирусных инфекций, редко поражают здоровых людей, эти заболевания всё чаще становятся осложнением у госпитализированных пациентов с различными хроническими заболеваниями, в первую очередь у иммунокомпрометированных больных. Успехи в лечении различных заболеваний, особенно онкогематологических, успехи в области трансплантации органов с последующей иммуносупрессивной терапией, внедрение новых инвазивных медицинских технологий как диагностических, так и терапевтических, пандемия ВИЧ-инфекции, эффективное и широко распространённое длительное лечение бактериальных инфекций, результативные новые методы выхаживания новорождённых привели к резкому увеличению случаев инвазивных микозов. Доля пациентов с факторами риска развития микозов значительно увеличивается, количество инвазивных микозов у больных в отделениях реанимации и интенсивной терапии прогрессивно возрастает [1, 3, 4–6].

Наиболее часто нозокомиальными возбудителями микозов становятся грибы родов *Candida*, *Aspergillus*. Однако участились случаи инвазивных микозов, вызываемых грибами из порядка *Mucorales*, принадлежащими к роду *Fusarium* и другим представителям царства грибов. Структура возбудителей инвазивных микозов модифицируется: видовой состав расширяется, пропорции видового состава меняются [1, 7–10].

Повышение значимости инвазивных микозов в клинической практике привело к увеличению частоты использования противогрибковых препаратов системного применения, число которых в достаточной степени ограничено. Это неизбежно сопровождается формированием и распространением резистентности патогенных грибов к противогрибковым препаратам. В настоящем обзоре суммирована информация о возбудителях инвазивных микозов, противогрибко-

вых лекарственных препаратах, применяемых для терапии, устойчивости возбудителей инвазивных микозов к используемым в медицинской практике лекарственным средствам.

Инвазивные микозы и их возбудители

В октябре 2022 г. Всемирная организация здравоохранения впервые опубликовала перечень грибковых патогенов, опасных для здоровья человека. Перечень поделён на три категории: критический приоритет, высокий приоритет и средний приоритет. Всего в перечень попали 19 наименований грибов. В группу критического приоритета были включены виды *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* и *Candida albicans*. В перечень объектов высокого приоритета попали возбудители из семи групп: *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), *Histoplasma* spp., возбудители эумицетомы, *Mucorales*, *Fusarium* spp., *Candida tropicalis* и *Candida parapsilosis*. Группа среднего приоритета содержит *Scedosporium* spp., *Lomentospora prolificans*, *Coccidioides* spp., *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Cryptococcus gattii*, *Talaromyces marneffeii*, *Pneumocystis jirovecii* и *Paracoccidioides* spp. [11].

Принимая с уважением проделанную экспертами ВОЗ работу, ряд исследователей обратили внимание на некоторые недостатки в ранжировании приоритетности групп грибов. Так, G. Casalini и соавт. [12] привели в своей статье аргументы для пересмотра места в ранжированном списке некоторых приоритетных видов грибов, таких как представители *Candida* spp., порядка *Mucorales*, *Fusarium* spp., *Histoplasma* spp, *Coccidioides* и *Paracoccidioides* spp, возбудители эумицетомы, *T. marneffeii*, и *P. jirovecii* с учётом региональных различий по встречаемости и нагрузке грибковых заболеваний на систему здравоохранения. Так, по мнению G. Casalini и соавт. [12] рейтинг *C. albicans* переоценён с точки зрения реальной угрозы для здоровья населения, так как доля инфекционных заболеваний, вызываемых этим возбудителем, постепенно снижается с 70–80%, выявляемых в конце 20 века [13], до 40–60% в исследованиях последних лет [14–16]. В то же время доля заболеваний, причиной которых являются *N. glabratus* (*C. glabrata*) и *C. parapsilosis*, растёт [13], и рейтинг этих возбудителей должен быть повышен. Для этого целесообразно объединить их с другими видами патогенных грибов, вызывающих кандидемии, и отнести эту группу к категории критического приоритета [12].

Согласно перечню ВОЗ, представители порядка *Mucorales* входят в группу с высоким приори-

ритетом, находясь на восьмом месте из 19 [11, 12]. Тем не менее, в медицинском сообществе существует озабоченность взрывным ростом случаев мукоромикоза, произошедшим в Индии во время пандемии COVID-19. Проведённое в Индии мультицентровое эпидемиологическое исследование мукоромикоза, ассоциированного с коронавирусной болезнью, показало увеличение случаев мукоромикоза в 2,1 раза после начала пандемии. Наиболее весомыми факторами риска развития мукоромикоза у пациентов с диагностированным COVID-19 были: диабет, гематологические злокачественные заболевания, нейтропения, длительное применение глюкокортикоидов, приводящее к нарушению иммунной функции [17]. Уровень смертности от мукоромикоза составлял приблизительно 38% [18]. Недооценка системой здравоохранения потенциальной угрозы, которую представляют собой представители порядка Mucorales, диагностические трудности и неопределённость в стратегиях лечения могут нанести существенный урон здоровью населения, особенно входящих в группу риска или проживающих в регионах Юго-Восточной Азии.

Статус дрожжеподобного гриба *P. jirovecii* в перечне ВОЗ также скорее всего требует более высокой приоритизации. *P. jirovecii* вызывает пневмоцистную пневмонию у пациентов с ослабленным иммунитетом, имеющим в анамнезе ВИЧ/СПИД, злокачественные опухоли, другие иммунодефицитные состояния, например, возникающие вследствие принимающих иммунодепрессанты в связи с проведённой трансплантацией. Повышение приоритетности этого вида патогенного гриба необходимо из-за увеличения доли заболеваний, вызываемых *P. jirovecii*, и с несовершенством терапевтической стратегии при тяжёлом течении заболевания [12, 19].

Анализ перечня ВОЗ показывает, что наибольшую опасность представляют возбудители системных (инвазивных) микозов.

Количество пациентов с инвазивными микозами неуклонно растёт параллельно с увеличением числа лиц с различными иммунодефицитными состояниями. В группу риска входят больные с онкогематологическими заболеваниями, с осложнениями после хирургических вмешательств, находящиеся в отделениях интенсивной терапии и/или на длительном лечении антибактериальными средствами [1, 20, 21]. Факторами риска являются иммунодефицитные заболевания, например, СПИД, и лечение иммуносупрессивными препаратами [22].

Инвазивные микозы часто возникают как инфекционные осложнения у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [3]. В условиях ОРИТ во всём мире наиболее часто диагностируют такие микозы, как

инвазивный кандидоз, инвазивный аспергиллёз и инвазивный мукоромикоз [3, 23, 24]. Инвазивный кандидоз является основным грибковым инфекционным заболеванием, составляющим до 90% инвазивных микозов и занимающим третье место по значимости среди причин сепсиса в ОРИТ [25]. Среди инфекционных осложнений в отделениях реанимации и интенсивной терапии на долю кандидоза приходится 17% случаев [1, 26]. Смертность при инвазивном кандидозе достигает 40–47% [3, 27, 28]. Второй по значимости грибковой инфекцией, которая вызывает инвазивный микоз в отделениях интенсивной терапии является инвазивный аспергиллёз с частотой проявления до 6,9% и смертностью 60–90% [3, 29, 30].

Изменение стратегии лечения, включающей более интенсивное использование противогрибковой профилактики, произвело сдвиги в эпидемиологии микозов. И хотя виды, вызывающие кандидозы и аспергиллёзы, остаются наиболее частыми причинами инвазивных микозов, в настоящее время всё большее значение приобретают инвазивные заболевания, вызванные представителями порядка Mucorales, а также рода *Fusarium* [1, 3, 18, 31].

По данным российских регистров, чаще других инфекций в ОРИТ регистрируют инвазивный кандидоз. Доля пациентов с инвазивным кандидозом, выявляемом в ОРИТ, составляет 68% от всех случаев инвазивного кандидоза, в то время как инвазивный аспергиллёз в ОРИТ — это 12% от всех случаев инвазивного аспергиллёза, редкие инвазивные грибковые заболевания в отделениях ОРИТ занимают 32% от общего числа редких инвазивных микозов [3]. С увеличением иммунокомпроментированных пациентов, например больных онкогематологическими заболеваниями, получающих агрессивную химиотерапию, ВИЧ-инфицированных больных, пациентов после пересадки органов, увеличивается количество случаев инвазивных микозов, вызываемых редкими возбудителями [32–34].

Редкие внутрибольничные инвазивные микозы сложно диагностировать и лечить, что приводит к значительной смертности пациентов [35].

В 2024 г. была опубликована статья С. Н. Хостелиди и др. [3], в которой был приведён эпидемиологический анализ инвазивных микозов в ОРИТ лечебных учреждений Российской Федерации. Данные для анализа были получены из регистров больных инвазивными микозами, созданными на базе кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России. У больных инвазивным кандидозом были выделены представители 15 видов грибов, среди которых наибольшее количество штаммов отно-

силось к виду *C. albicans* (45%). На 4 вида приходилось 38% выделенных представителей возбудителей инвазивного кандидоза: *C. parapsilosis*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. auris*, *C. tropicalis* (рис. 1). Оставшиеся 17% от доли возбудителей распределены среди следующих видов: *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) (2%), *Candida guilliermondii* (2%), *Candida dubliniensis* (2%), *Candida intermedia* (1%), *Candida lusitanae* (1%), *Candida metapsilosis* (1%), *Candida norvegensis* (1%), *Candida famata* (1%), *Candida inconspicua* (1%), *Candida lipolytica* (1%), *Candida* spp. (4%). Общая смертность пациентов отделения интенсивной терапии, у которых был выявлен инвазивный кандидоз, составила 33% [3].

Инвазивный аспергиллёз развивался у пациентов со следующими фоновыми заболеваниями: онкогематологические заболевания, тяжёлая пневмония, аутоиммунная патология, злокачественные новообразования и прочие нозологии, встречающиеся реже перечисленных [3]. Среди выявленных возбудителей инвазивного аспергиллёза основными были *A. fumigatus* (54%), *Aspergillus niger* (22%) и *Aspergillus flavus* (17%) [3]. Также были выявлены в 7% случаев *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, относящиеся к криптоическим видам. Общая смертность пациентов с инвазивным аспергиллёзом составила 52% [3].

Инвазивный мукоромикоз у пациентов в отделениях ОРИТ вызывали следующие возбудители *Rhizopus* spp. (46%), *Rhizomucor* spp. (18%), *Lichtheimia* spp. (14%), *Mucor* spp. (12%) [5]. Общая смертность больных с мукоромикозом в отделениях интенсивной терапии достигала 63% после 3 мес. [3].

Идентифицированные возбудители, вызывающие редкие плесневые инвазивные микозы, были *Fusarium* spp. (35%), *Paecilomyces* spp. (25%), *Acremonium* spp. (10%), *Trichoderma* spp. (10%), *Exophiala* spp. (5%), *Scopulariopsis* spp. (5%), *Scedosporium* spp. (5%), *Cladosporium* spp. (5%).

В период с 2018 по 2022 гг. Европейская конфедерация медицинской микологии (ЕСММ) провела многоцентровое обсервационное исследование распространения *Candida* spp. и её резистентности к противогрибковым препаратам при кандидемии по всей Европе. Были собраны и идентифицированы изоляты из 41 центра в 17 странах, всего 399 изолятов. Распределение долей видов составило: *C. albicans* (47,1%), *N. glabrata* (*C. glabrata*) (22,3%), *C. parapsilosis* (15,0%), *C. tropicalis* (6,3%), *C. dubliniensis* и *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) (по 2,3%) и другие виды (4,8%) (рис. 2). Самая высокая доля *C. albicans* была зафиксирована в Австрии (77%), самые высокие доли *N. glabrata* (*C. glabrata*) были обнаружены в Чешской республике, Франции и Великобритании — 25–33%, наибольшее количество *C. parapsilosis* встретилось

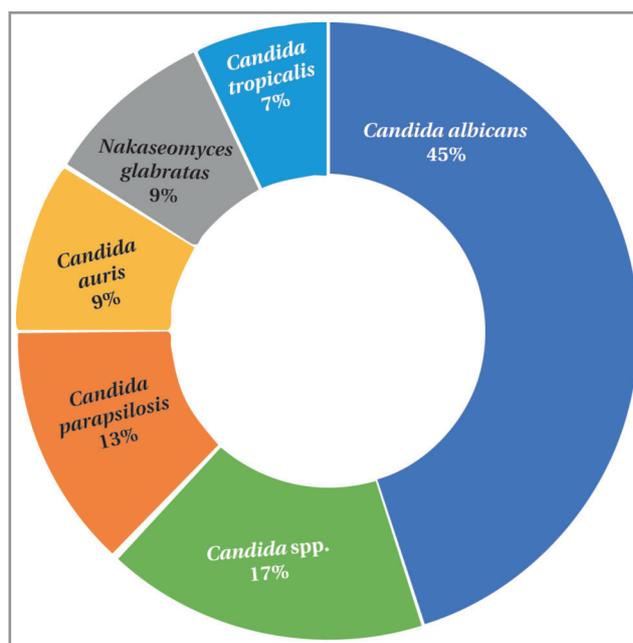


Рис. 1. Основные возбудители инвазивного кандидоза, выявленные в ОРИТ лечебных учреждений, по данным регистров больных инвазивными микозами, созданных на кафедре клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России [3].

Fig. 1. The main pathogens of invasive candidiasis identified in the intensive care units of medical institutions according to the registers of patients with invasive mycoses created at the Department of Clinical Mycology, Allergology, and Immunology of the North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov of the Ministry of Health of the Russian Federation [3].

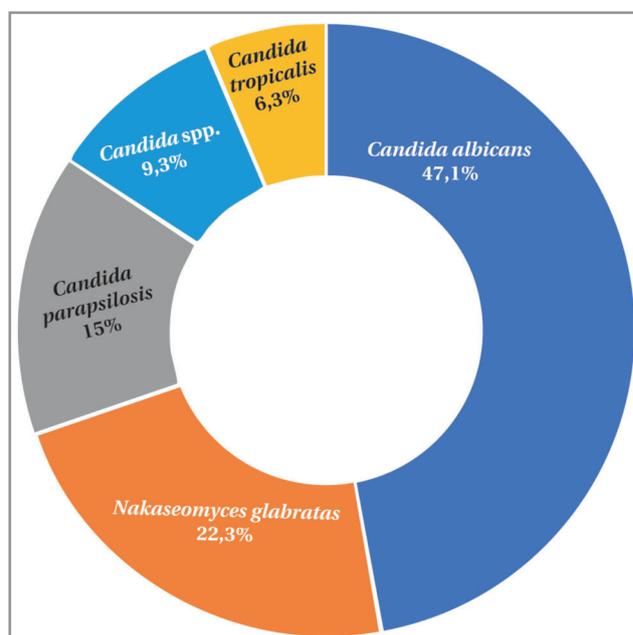


Рис. 2. Основные возбудители кандидемии в Европе [13].

Fig. 2. Main pathogens of candidemia in Europe [13].

среди изолятов, полученных из Италии и Турции, до 24–26% [13].

Масштабные исследования в Северной Америке в области мониторинга антимикробных препаратов, в том числе противогрибковых, выявили, что по сравнению с другими регионами мира в Северной Америке самый высокий уровень инвазивных кандидозов, вызванных *N. glabrata* (*C. glabrata*) (24,6%) и самый низкий уровень инвазивных кандидозов, вызванных *C. albicans* (42,7%). В отчётах отдельных центров было показано, что в некоторых группах населения случаи заражения *N. glabrata* (*C. glabrata*) могут превышать заражение, вызванное *C. albicans* [36].

Повышение значимости патогенных грибов в этиологии госпитальных инфекций, в том числе у пациентов отделений ОРИТ, привело к более широкому использованию лекарственных противогрибковых препаратов. Это в свою очередь способствовало всё большей встречаемости резистентности патогенных грибов и грибов, вызывающих инвазивные микозы. Устойчивость патогенных грибов к широко используемым противогрибковым препаратам, перечень которых и так весьма скромный, постоянно растёт.

Противогрибковые лекарственные препараты, применяемые при лечении инвазивных микозов

Количество групп и наименований противогрибковых лекарственных препаратов, которые используют для лечения микозов, достаточно ограничено и значительно уступает числу групп и наименований антибактериальных лекарственных средств. Для лечения инвазивных микозов, как правило, используют препараты для системного применения из групп полиенов, азолов, эхинокандинов, и фторпиримидинов (флуцитозин).

Из группы полиенов в терапии инвазивных микозов используют препараты амфотерицина В и его липидные лекарственные формы. Существует три варианта препарата на основе липидов: коллоидная дисперсия амфотерицина В, липидный комплекс амфотерицина В и липосомальный амфотерицин В. Амфотерицин В проявляет биологическую активность в отношении большинства изолятов рода *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatidis*, *Rhodotorula* spp., *Sporothrix schenckii*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus* spp., *Absidia* spp., *Basidiobolus ranarum*, *Aspergillus fumigatus*. К амфотерицину В, как правило, устойчивы *Fusarium* spp., *Aspergillus terreus*, *Trichosporon* spp. и *Pseudallescheria boydii*. К полиенам быстро приобретают устойчивость

изоляты *Candida lusitaniae*. Механизм действия амфотерицина В основан на его связывании с эргостеролом цитоплазматической мембраны грибов, что приводит к нарушению проницаемости мембраны и затем к гибели клетки [37, 38].

Азольные антимикотики ингибируют синтез эргостерола, что приводит к нарушению роста и гибели клеток. Из числа азолов для лечения системных микозов применяют вориконазол, итраконазол, позаконазол, флуконазол.

Вориконазол применяется при лечении инвазивного кандидоза, инвазивного аспергиллёза, а также для лечения фузариоза и инфекций, вызываемых *Scedosporium* spp. Вориконазол обладает клинической эффективностью с частичным или полным ответом при лечении грибных инфекций, вызванных представителями рода *Candida*, включая штаммы *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*, рода *Aspergillus*, включая *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*. Препарат обладает эффективностью в отношении некоторых штаммов *Fusarium* spp., *C. dubliniensis*, *C. inconspicua* и *C. guilliermondii*, *Scedosporium* spp. Вориконазол не обладает активностью в отношении представителей зигомицетов, таких как *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., поэтому препарат не следует использовать при лечении инфекций, с подозрением на патоген из порядка Mucorales [37, 38].

К итраконазолу чувствительны такие возбудители кандидоза, как *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Наименее чувствительными к итраконазолу видами, вызывающими кандидоз, являются *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *N. glabrata* (*C. glabrata*) и *C. tropicalis*. Итраконазол активен в отношении *C. neoformans*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Histoplasma* spp., *P. brasiliensis*; *S. schenckii*; *Fonsecaea* spp.; *Cladosporium* spp.; *B. dermatitidis*; *C. immitis*, *P. boydii*; *Penicillium marneffeii*, *Epidermophyton* spp., *Trichophyton* spp., *Microsporium* spp. и некоторых других грибов [37, 38].

Позаконазол — один из новых триазолов на рынке. В клинических исследованиях была показана эффективность препарата в отношении инфекций, вызванных представителями рода *Aspergillus*, включая *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ustus*, *A. ochraceus*, представителями *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. parapsilosis*, *C. neoformans*, *C. immitis*, *F. pedrosoi*, *H. capsulatum*, *P. boydii*, *Alternaria* spp., *Exophiala* spp., *Fusarium* spp., *Ramichloridium* spp., *Rhizomucor* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. Клинические изоляты *C. albicans* и *A. fumigatus* со сниженной чувствительностью к позаконазолу встречаются редко [37, 38].

Флуконазол эффективен при инфекциях, вызванных представителями рода *Candida* spp., проявляет активность в отношении *C. neoformans*, *Mi-*

crosporum spp., *Trichophyton* spp., а также при инфекциях, вызванных возбудителями *B. dermatitidis*, *C. immitis* и *H. capsulatum*. *C. krusei* обладает природной устойчивостью к действию флуконазола. *N. glabrata* (*C. glabrata*) имеет сниженную чувствительность к флуконазолу. Представители вида *C. auris* устойчивы к воздействию флуконазола [37, 38].

Эхинокандины занимают лидирующие позиции в лечении инфекций, вызванных представителями рода *Candida*. Механизм действия эхинокандинов основан на ингибировании синтеза 1,3- β -D-глюкана клеточной стенки грибов, что приводит к нарушению роста гриба, а затем к гибели клетки. У эхинокандинов не выявлена активность в отношении *C. neoformans* и микромицетов, не относящихся к роду *Aspergillus*. Из этой группы лекарственных препаратов для лечения инвазивных микозов используют каспофунгин, микафунгин, анидулафунгин.

Каспофунгин активен в отношении видов рода *Candida*, включая *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. guilliermondii*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, и видов рода *Aspergillus*, включая *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*. Есть сообщения о развитии лекарственно-резистентных изолятов *Candida* или *Aspergillus* [37, 38].

Микафунгин проявляет фунгицидную активность в отношении грибов рода *Candida* spp., *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. kefir*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* и значительно ингибирует активный рост чувствительных к микафунгину представителей рода *Aspergillus*, а также включая *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*. Клинические данные об эффективности в лечении инвазивного аспергиллёза ограничены [36]. Также микафунгин активен в отношении *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis*. Действующее вещество не проявляет активности в отношении *Cryptococcus* spp., *Pseudallescheria* spp., *Scedosporium* spp., *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Zygomycetes* spp. [37, 38].

Анидулафунгин проявляет высокую активность в отношении видов рода *Candida*, включая *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* и *C. guilliermondii* и рода *Aspergillus*, включая *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* и *A. terreus*. В настоящее время анидулафунгин используют при лечении кандидемии и кандидоза [37, 38].

Флуцитозин обладает ограниченным спектром активности, который включает только *Candida*, *Cryptococcus* spp., а также характеризуется быстрым формированием приобретённой резистентности. Антимикотическое действие флуцитозина связано с нарушением синтеза ДНК и РНК грибов, ингибируя тимидилатсинтазу [37, 38].

За последние два десятилетия в клиническую практику были введены новые препараты: представитель азолов (триазолов) — изавуконазол, представитель нового класса противогрибковых препаратов (тритерпеноидов) — ибрексафунгерп, представитель эхинокандинов — резафунгин. Изавуконазол — новейший из клинически доступных в текущее время триазолов нового поколения, одобренный в 2015 г. для терапии инвазивного аспергиллёза и инвазивного мукормикоза [39]. Ибрексафунгерп был одобрен в США в 2021 г. для лечения вульвовагинального кандидоза. В настоящий момент ибрексафунгерп изучают в нескольких клинических исследованиях для лечения инвазивного кандидоза и кандидемии, вызванных *C. auris*, инвазивного аспергиллёза [40]. Резафунгин получил одобрение в США в марте 2023 г., в Европейском союзе в декабре 2023 г. для лечения кандидемии и инвазивного кандидоза. Спектр активности нового эхинокандина включает практически все клинически значимые виды рода *Candida* (в том числе *C. auris*) и рода *Aspergillus*, включая азол- и эхинокандин-резистентные изоляты, а также *Pneumocystis jirovecii* [41].

Из находящихся на стадии клинических исследований интересными с точки зрения эффективности исследователи называют фосманогепикс, олорофим, опелконазол, отесеконазол, пероральную форму амфотерицина В [42, 43].

Устойчивость возбудителей инвазивных микозов к противогрибковым препаратам

В результате возрастающего количества случаев использования противогрибковых препаратов для лечения и профилактики инвазивных микозов, включаются механизмы «селективного давления», который ведёт к распространению устойчивых штаммов-возбудителей системных микозов [44]. В результате устойчивого роста количества случаев инвазивных микозов, число выявляемых устойчивых к антимикотикам штаммов патогенных грибов растёт во всём мире [36].

Самыми распространёнными возбудителями инвазивного кандидоза являются *C. albicans* (15–60% случаев), *C. parapsilosis* (5–40% случаев), *N. glabrata* (*C. glabrata*) (5–25% случаев), *C. auris* (5–9% случаев), *C. tropicalis* (5–15% случаев), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) (3–7% случаев) [1, 3, 6, 45, 46].

Чувствительность изолятов основных возбудителей кандидоза к противогрибковым препаратам из трёх групп: азолы (флуконазол, вориконазол), полиены (амфотерицин В), эхинокандины, распределяется следующим образом. Более 75%

**Чувствительность изолятов грибов — возбудителей инвазивного кандидоза к противогрибковым препаратам [3]
Sensitivity of fungi isolates causing invasive candidiasis to antifungal drugs [3]**

Вид	Доля от выделенных изолятов возбудителей инвазивного кандидоза	Чувствительность к противогрибковым препаратам
<i>Candida albicans</i>	45%	Чувствительность >75% к флуконазолу, вориконазолу, амфотерицину В, эхинокандину.
<i>Candida parapsilosis</i>	13%	Чувствительность >75% к вориконазолу, амфотерицину В. Встречается устойчивость к флуконазолу и эхинокандину.
<i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	9%	Чувствительность к эхинокандину, дозозависимая чувствительность >5% исследованных изолятов к флуконазолу и вориконазолу. Встречаются изоляты с резистентностью к флуконазолу, вориконазолу, амфотерицину В.
<i>Candida auris</i>	9%	Резистентность к флуконазолу, вориконазолу, амфотерицину В, эхинокандинам. Менее 5% изолятов <i>C.auris</i> чувствительны к азолам (флуконазол, вориконазол), до 30% резистентны к амфотерицину В.
<i>Candida tropicalis</i>	7%	Чувствительность >75% изолятов к амфотерицину В, эхинокандину. Встречается резистентность к азолам (флуконазол, вориконазол).

изолятов *C. albicans* обладают чувствительностью ко всем группам перечисленных противогрибковых препаратов [3]. В отличие от штаммов этого вида изоляты *C. auris* проявляют резистентность к изученным группам препаратов. Менее 5% изолятов *C. auris* чувствительны к азолам (флуконазол, вориконазол), 30% изолятов резистентны к амфотерицину В, до 10% изолятов проявляют резистентность к эхинокандинам (таблица) [3]. Лидирующие позиции в терапии инвазивных кандидозов занимают препараты из группы эхинокандинов, так как обладают выраженной фунгицидной активностью в отношении как *C. albicans*, так и других клинически значимых видов, таких как *N. glabrata* (*C. glabrata*) и *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), обладающих природной устойчивостью к азолам, и *C. lusitanae* с природной резистентностью к амфотерицину В [47].

Согласно данным, приведённым в статье С.Н.Хостелиди и др. [3], в Российской Федерации наиболее часто для лечения инвазивного кандидоза применяют флуконазол, а общая смертность достигает 33%. На сегодня выявлены резистентные к этому антибиотику изоляты пяти из шести самых распространённых видов возбудителей инвазивного кандидоза: *C. auris*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. parapsilosis*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*. Более 75% изолятов *C. albicans* чувствительны к флуконазолу, но и среди представителей этого вида есть устойчивые штаммы. В исследовании, проведённом в российских лечебных учреждениях, все выделенные у пациентов ОРИТ штаммы *C. auris* были устойчивы к флуконазолу и вориконазолу и чувствительны в 100% случаев к эхинокандинам (каспофунгину и микафунгину) [3].

Изучение чувствительности штаммов *Candida* spp., полученных из медицинских центров Европы, продемонстрировало, что все изоляты

были восприимчивы к амфотерицину В [13]. К флуконазолу проявляли устойчивость 4% изолятов *C. tropicalis*, 12% изолятов *N. glabrata* (*C. glabrata*), 17% изолятов *C. parapsilosis*, 20% штаммов других представителей рода *Candida*. Штаммы *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. parapsilosis* обладали перекрёстной устойчивостью к флуконазолу и вориконазолу. Были обнаружены изоляты, устойчивые к эхинокандинам, а именно к анидулафунгину и микафунгину [13].

В мировых исследованиях по программе SENTRY изоляты *Candida* spp. проявляют различную чувствительность к азольным антимикотикам. Среди изолятов *C. albicans* около 0,3% проявляют устойчивость к флуконазолу, среди *N. glabrata* (*C. glabrata*) — 8,1%, *C. tropicalis* — 3,2%, *C. parapsilosis* — 3,9%. Уровень устойчивости изолятов зависит от исследуемого региона [36]. Самые высокие показатели устойчивости к *N. glabrata* (*C. glabrata*) наблюдались в Северной Америке (10,6%), за ней следовал Азиатско-Тихоокеанский регион (6,8%), Европа (4,9%) и Латинская Америка (2,6%). В отличие от *N. glabrata* (*C. glabrata*), устойчивость *C. parapsilosis* к флуконазолу выше в Европе (4,6%) и Латинской Америке (4,3%) по сравнению с Северной Америкой (3,7%) и Азиатско-Тихоокеанским регионом (0,6%) [36, 48].

Препаратами первой линии для лечения инвазивного кандидоза являются эхинокандины (каспофунгин, микафунгин и анидулафунгин). На сегодняшний день показатели устойчивости изолятов рода *Candida* остаются низкими *C. albicans* (0–0,1%), *C. parapsilosis* (0–0,1%), *C. tropicalis* (0,5–0,7%), *N. glabrata* (*C. glabrata*) (1,7–3,5%) и *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) (0–1,7%) [36, 48]. Изоляты *C. glabrata* являются самыми устойчивыми к эхинокандинам, при этом самая высокая устойчивость наблюдается к аниду-

лафунгину (3,5%) и самая низкая — к микафунгину (1,7%). Устойчивые изоляты *C. glabrata*, как правило, были невосприимчивы/резистентны по крайней мере к двум эхинокандинам, при этом 78,4% всех устойчивых изолятов были невосприимчивы ко всем эхинокандинам [48, 49].

Вид *C. auris* продолжает вызывать высокую озабоченность в здравоохранении из-за своей множественной лекарственной устойчивости и способности быстро распространяться среди тяжелобольных пациентов в отделениях интенсивной терапии. Так, в Индии при исследовании изолятов *C. auris* было установлено, что 90% изолятов были устойчивы к флуконазолу, 8% — к амфотерицину В, 2% — к анидулафунгину и 2% — к микафунгину [50]. Исследование изолятов *C. auris*, собранных в Африке, Азии и Южной Америке, выявили, что 93% изолятов были устойчивы к флуконазолу, 35% — к амфотерицину В и 7% — к эхинокандинам. Устойчивость одновременно к двум противогрибковым препаратам наблюдалась у 41% изолятов [51].

Среди механизмов резистентности *Candida* spp. к антимикотикам наибольшее внимание уделяют двум механизмам: способности к образованию биоплёнок и генетическим мутациям, снижающим чувствительность к противогрибковым препаратам. Так, например, при возникновении резистентности к триазолам (флуконазол, вориконазол и др.) внимание исследователи уделяют изучению структуры и роли гена *ERG11*, кодирующего фермент ланостерол-14-деметилазу, которая способствует повышению количества эргостерола в мембране [1, 52–54]. Также механизмами возникновения устойчивости к триазолам являются снижение проницаемости клеточной стенки грибов [55, 56] и эффлюкс — активный вывод препарата из клетки [55, 57, 58]. Устойчивость *Candida* spp. к полиенам, в частности к амфотерицину В, зачастую возникает посредством мутаций, ведущим к снижению содержания эргостерола в клеточной мембране грибов [53].

Общим механизмом возникновения резистентности представителей рода *Candida* к эхинокандинам является изменение числа локусов для их связывания в стенке, кодирующих продукцию 1,3-β-D-глюкан-синтетазы, в связи с мутацией генов *FKS* (*FKS1*, *FKS2*) или гиперпродукция альтернативных компонентов клеточной стенки, например хитина [53, 59].

Наиболее распространённым видом рода *Aspergillus*, вызывающим инвазивный аспергиллёз является *A. fumigatus*, за ним следуют виды *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* и *A. nidulan*. Часто инвазивный аспергиллёз формируется у пациентов с онкогематологическими заболеваниями, пациентов после пересадки органов, у пациентов на гемодиализе [32]. Растёт число пациентов с инвазивным аспергиллё-

зом в отделениях ОРИТ [1, 60]. Возбудители аспергиллёза обладают природной устойчивостью к флуконазолу и флуцитозину [61, 62]. Чувствительность клинических штаммов *Aspergillus* spp. к амфотерицину В прежде всего определяется их видовой принадлежностью. К амфотерицину В сниженная чувствительность встречается у видов *A. flavus*, *A. terreus* и *A. ochraceus* [63].

Азольные противогрибковые средства были основой терапии аспергиллёзов. Устойчивость к азолам у представителей рода *Aspergillus* возникает прежде всего из-за длительного применения этих лекарственных средств. Устойчивость *A. fumigatus* к азолам варьирует от 0 до 26,1% в разных регионах мира [36, 64]. Передача азолорезистентных возбудителей *Aspergillus* от пациента к пациенту не описана, поэтому предполагается, что появление резистентной *Aspergillus* инфекции у пациента, не принимавшего ранее азольные препараты, может быть связано с контактированием со спорами *Aspergillus*, которые подвергались воздействию сельскохозяйственных фунгицидов, среди которых существенная доля приходится на препараты азолов [36]. Виды рода *Aspergillus* не показывают устойчивость к эхинокандинам [65]. Устойчивость *Aspergillus* к эхинокандинам практически не обсуждается в современной литературе [36]. Известно, что у *A. alliaceus*, генетически схожего с *A. flavus*, высокие значения минимальной подавляющей концентрации эхинокандинов, следовательно эти грибы могут иметь сниженную чувствительность к препаратам [36, 65].

Основными факторами устойчивости к антимикотикам у грибов является внутренняя резистентность вида, а также длительный приём противогрибковых препаратов. В полной мере это утверждение относится к патогенным грибам — возбудителям системных микозов. Уже на стадии идентификации вида возбудителя можно прогнозировать устойчивость объекта к антимикотикам. При длительном, свыше 30 дней лечении антимикотиками резко возрастает вероятность возникновения приобретённой устойчивости. Такой фактор приобретения лекарственной устойчивости, как горизонтальный перенос генов для патогенных грибов, вызывающих инвазивные микозы, в целом не характерен. Хотя нужно отметить, что для *A. fumigatus* в лабораторных условиях зафиксирован перенос генов устойчивости к азолам [66].

Резистентность чаще всего обусловлена внутренней резистентностью вида и несомненную опасность имеет передача от пациента к пациенту резистентного клона.

Заключение

Парадокс ситуации с распространением и увеличением числа случаев заболевания инва-

живными микозами состоит в том, что масштабы этой проблемы будут продолжать увеличиваться, в том числе из-за успехов медицины в области лечения онкологических и онкогематологических заболеваний, трансплантации органов, выхаживания недоношенных детей, внедрения новых инвазивных методов диагностики и лечения.

Анализ проблемы показывает, что перечень патогенных для человека грибов будет расширяться за счёт включения новых видов с неизученными свойствами и возможной природной устойчивостью к существующим противогрибковым препаратам. Также будет возрастать количество штаммов грибов-патогенов с приобретённой лекарственной устойчивостью. Дальнейшее возникновение резистентных штаммов по-прежнему будет связано не только с клиническим использованием противогрибковых препаратов по не всегда оптимальным протоколам лечения, но и с их широким применением в сельском хозяйстве.

Решению проблемы лечения инвазивных микозов препятствует относительно небольшой набор эффективных противогрибковых лекарственных препаратов и наличие у подавляющего числа из них выраженных побочных эффектов. Ни одобренные в настоящее время системные противогрибковые препараты, ни препараты, которые находятся в клинических испытаниях, не решают в полной мере проблемы, с которыми сталкиваются работники здравоохранения.

К решению проблемы с инвазивными микозами научное сообщество и система здравоохранения начали подступаться с начала текущего века, о чём свидетельствует увеличение научных публикаций на эту тему, а также впервые опубликованный ВОЗ перечень грибковых патогенов, опасных для здоровья человека.

Литература/References

1. Акимкин В. Г., Тутельян А. В., Шулакова Н. И. Микологический айсберг: современные сдвиги в эпидемиологии микозов. Инфекционные болезни. 2022; 20 (4): 120–126. doi: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-1-120-126>. [Akimkin V. G., Tutelyan A. V., Shulakova N. I. Medical mycological iceberg recent trends in the epidemiology of mycoses. *Infektsionnye bolezni*. 2022; 20 (4): 120–126. doi: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-1-120-126>. (in Russian)]
2. Рамазанова Б. А., Батырбаева Д. Ж., Бекназарова А. Н. Различные виды грибковых инфекции у онкологических больных (обзор литературы). Вестник КАЗНМУ. 2015; 3: 47–55. [Ramazanova B. A., Baturbaeva D. Zh., Beknazarova A. N. Varieties types of fungal infections in cancer patients. *Vestnik KAZNМУ*. 2015; 3: 47–55 (in Russian)]
3. Хостелиди С. Н., Козлова О. П., Шадривова О. В., Шагдильева Е. В., Борзова Ю. В., Смирнов С. А. и др. Инвазивные микозы в отделениях реанимации и интенсивной терапии (анализ данных регистров и обзор литературы). Проблемы медицинской микологии. 2024; 26 (1): 3–21. [Khostelidi S. N., Kozlova O. P., Shadrivova O. V., Shagdileeva E. V., Borzova Yu. V., Smirnov S. A. et al. Invasive mycoses in intensive care units (analysis of registry data and literature review). *Problems in Medical Mycology*. 2024; 26 (1): 3–21. (in Russian)] doi: [10.24412/1999-6780-2024-1-3-21](https://doi.org/10.24412/1999-6780-2024-1-3-21).
4. Попов Д. А., Белобородова Н. В., Седракан А. Р. Послеоперационные кандидемии. Клиническая анестезиология и реаниматология. 2009; 6 (1): 4–13. [Popov D. A., Beloborodova N. V., Sedrakan A. R. Posleoperatsionnye kandidemii. *Klinicheskaya anesteziologiya i reanimatologiya*. 2009; 6 (1): 4–13. 20. (in Russian)]

Стратегия борьбы с проблемой увеличения случаев инвазивных микозов должна включать прежде всего следующие меры:

— оптимизация протоколов лечения инвазивных микозов существующими лекарственными препаратами с учётом региональных санитарно-эпидемиологических особенностей;

— фундаментальные исследования механизмов устойчивости патогенных грибов к лекарственным препаратам, разработка путей преодоления резистентности;

— поиск новых антимикотиков, относящихся как к уже существующим химическим классам соединений, так и к новым.

Успех данной стратегии будет во многом зависеть от поддержки фундаментальных и прикладных научных исследований.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов. Автономова А. В. — сбор информации, анализ данных, написание текста, редактирование; Краснопольская Л. М. — написание текста, редактирование, финальное утверждение рукописи.

Additional Information

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest related to the publication of this article.

Authors' participation.

Autonomova A. V. — information collection, data analysis, text writing, editing; Krasnopolskaya L. M. — text writing, editing, final approval of the manuscript.

5. Ларионова В. Б., Быков Д. А. Кандидоз при гемобластозах. Онкогематология. 2007; 1: 62–41. [Larionova V. B., Bykov D. A. Candidiasis in hematologic malignancies. *Onkogematologiya*. 2007; 1: 62–71. (in Russian)]
6. Васильева Н. В., Клишко Н. Н., Цинзерлинг В. А. Диагностика и лечение инвазивных микозов: современные рекомендации. [Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. 2010; 2 (4): 5–18. [Vasileva N. V., Klimko N. N., Tsinzerling V. A. Diagnostika i lechenie invazivnykh mikofov: sovremennye rekomendatsii. *Vestnik Sankt-Peterburgskoi meditsinskoi akademii poslediplomnogo obrazovaniya*. 2010; 2 (4): 5–18. (in Russian)]
7. Richardson M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15 Suppl 5: 2–9. doi: [10.1111/j.1469-0691.2009.02972.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02972.x).
8. Antoniadou A. Outbreaks of zygomycosis in hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15 Suppl 5: 55–59. doi: [10.1111/j.1469-0691.2009.02982.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02982.x).
9. Repetto E. C., Giacomazzi C. G., Castelli F. Hospital-related outbreaks due to rare fungal pathogens: a review of the literature from 1990 to June 2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31 (11): 2897–2904. doi: [10.1007/s10096-012-1661-3](https://doi.org/10.1007/s10096-012-1661-3).
10. Tahiri G., Lax C., Cánovas-Márquez J. T., Carrillo-Marín P., Sanchis M., Navarro E., Garre V., Nicolás F. E. Mucorales and mucormycosis: recent insights and future prospects. *Journal of Fungi*. 2023; 9 (3): 335. doi: [10.3390/jof9030335](https://doi.org/10.3390/jof9030335).
11. World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. — World Health Organization, 2022. URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/>

- 363682/9789240060241-eng.pdf?sequence = 1 (дата обращения 20.09.2024)
12. *Casalini G., Giacomelli A., Antinori S.* The WHO fungal priority pathogens list: a crucial reappraisal to review the prioritisation. *Lancet Microbe.* 2024; 5 (7): 717–724. doi: 10.1016/S2666-5247 (24)00042-9.
 13. *Arendrup M. C., Arikan-Akdagli S., Jørgensen K. M., Barac A., Steinmann J., Toscano C., et al.* European candidaemia is characterised by notable differential epidemiology and susceptibility pattern: Results from the ECMM Candida III study. *J Infect.* 2023; 87 (5): 428–437. doi: 10.1016/j.jinf.2023.08.001.
 14. *Tsay S. V., Mu Y., Williams S., Epson E., Nadle J., Bamberg W. M., et al.* Burden of candidemia in the United States, 2017. *Clinical Infectious Diseases* 2020; 71 (9): e449–e453 doi: 10.1093/cid/ciaa193.
 15. *Risum M., Astvad K., Johansen H. K., Schönheyder H. C., Rosenvinge F., Knudsen J. D. et al.* Update 2016–2018 of the nationwide Danish fungaemia surveillance study: epidemiological changes in a 15-year perspective. *Journal of Fungi (Basel).* 2021; 7 (6): 491. doi: 10.3390/jof7060491.
 16. *Bretagne S., Sitbon K., Desnos-Ollivier M., Garcia-Hermoso D., Letcher-Bru V., Cassaing S. et al.* Active surveillance program to increase awareness on invasive fungal diseases: the French RESSIF Network (2012 to 2018). *mBio.* 2022; 13 (3): e0092022. doi: 10.1128/mbio.00920-22.
 17. *Özbek L., Topçu U., Manay M., Esen B. H., Bektaş S. N., Aydın S. et al.* COVID-19-associated mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of 958 cases. *Clinical Microbiology and Infection.* 2023; 29 (6): 722–731. doi: 10.1016/j.cmi.2023.03.008.
 18. *Patel A., Agarwal R., Radramurthy S. M., Shevkani M., Xess I., Sharma R. et al.* Multicenter epidemiologic study of coronavirus disease-associated mucormycosis, India. *Emerging infectious diseases.* 2021; 27 (9): 2349–2359. doi: 10.3201/eid2709.210934.
 19. *McDonald E. G., Butler-Laporte G., Del Corpo O., Hsu J. M., Lawandi A., Senecal J. et al.* On the treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: current practice based on outdated evidence. *Open forum infectious diseases.* 2021; 8 (12): ofab545. doi: 10.1093/ofid/ofab545.
 20. *Петухова И. Н., Дмитриева Н. В., Багирова Н. С., Кулага Е. В., Соколова В. И., Соколова Е. Н., и др.* Грибковые суперинфекции в онкологии. Российский медицинский журнал. 2003; 11: 685. [Petukhova I. N., Dmitrieva N. V., Bagirova N. S., Kulaga E. V., Sokolova V. I., Sokolova E. N., i dr. Gribkovye superinfeksii v onkologii. Rossiiskii meditsinskii zhurnal. 2003; 11: 685. (in Russian)]
 21. *Логинова О. П., Шевченко Н. И.* Таксономическая структура и резистентность кандид у онкогематологических пациентов. Успехи медицинской микологии. 2022; 23: 139–141. [Loginova O. P., Shevchenko N. I. Taksonomicheskaya struktura i rezistentnost' kandid u onkogematologicheskikh patsientov. Uspekhi meditsinskoi mikologii. 2022; 23: 139–141 (in Russian)]
 22. *Morris A. M.* Review: voriconazole for prevention or treatment of invasive fungal infections in cancer with neutropenia. *Ann Intern Med.* 2014; 161 (2): JC8. doi: 10.7326/0003-4819-161-2-201407150-02008.
 23. *Paramythiotou E., Frantzeskaki F., Flevari A., Armaganidis A., Dimopoulos G.* Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules.* 2014; 19 (1): 1085–1119. doi: 10.3390/molecules19011085.
 24. *Benedict K., Jackson B. R., Chiller T., Beer K. D.* Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 68 (11): 1791–1797. doi: 10.1093/cid/ciy776.
 25. *Tragiannidis A., Tsoulas C., Kerl K., Groll A. H.* Invasive candidiasis: Update on current pharmacotherapy options and future perspectives. *Expert Opin. Pharmacother.* 2013; 14: 1515–1528. doi: 10.1517/14656566.2013.805204.
 26. *Карпун Н. А., Бурова С. А., Евдокимов Е. А., Чаус Н. И.* Инвазивный кандидоз в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Медицинский алфавит. 2014; 2: 22–25. [Karpun N. A., Burova S. A., Evdokimov E. A., Chaus N. I. Invazivnyi kandidoz v otdeleniyakh reanimatsii i intensivnoi terapii. Meditsinskii alfavit. 2014; 2: 22–25. (in Russian)]
 27. *Habighorst K., Sanders J. M., Hennessy S. A., Goff K., Wan B., Johns M.* Identification of risk factors for intra-abdominal candidiasis. *Surg Infect (Larchmt).* 2023; 24 (10): 910–915. doi: 10.1089/sur.2023.149.
 28. *Bing J., Du H., Guo P., Hu T., Xiao V., Lu S. et al.* Candida auris-associated hospitalizations and outbreaks, China, 2018–2023. *Emerging Microbes & Infections.* 2024; 13 (1): 2302843. doi: 10.1080/22221751.2024.2302843.
 29. *Paramythiotou E., Frantzeskaki F., Flevari A., Armaganidis A., Dimopoulos G.* Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules.* 2014; 19 (1): 1085–1119. doi: 10.3390/molecules19011085.
 30. *Dimopoulos G., Frantzeskaki F., Poulakou G., Armaganidis A.* Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1272: 31–39. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06805.x.
 31. *Hassler A., Lieb A., Seidel D., Cesaro S., Greil J., Klimkoet N. et al.* Disseminated fusariosis in immunocompromised children-analysis of recent cases identified in the Global Fungiscope Registry. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2017; 36 (2): 230–231. doi.org/10.1097/INF.0000000000001396.
 32. *Richardson M., Class-Fleur L. K.* Changes in the epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (Adj. 4): 5–24. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.01978.x.
 33. *Marr K. A., Carter R. A., Crippa E., Wald A., Corey L.* Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002 Apr 1; 34 (7): 909–917. doi: 10.1086/339202.
 34. *Lass-Flörl C.* The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* 2009; 52 (3): 197–205. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01691.x.
 35. *Repetto E. C., Giacomazzi C. G., Castelli F.* Hospital-related outbreaks due to rare fungal pathogens: a review of the literature from 1990 to June 2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31 (11): 2897–904. doi: 10.1007/s10096-012-1661-3.
 36. *Hendrickson J. A., Hu C., Aitken S. L., Beyda N.* Antifungal resistance: a concerning trend for the present and future. *Current infectious disease reports.* 2019; 21 (12): 47. doi: 10.1007/s11908-019-0702-9.
 37. *Сидоренко И. А., Налетов С. В., Налетова Е. Н., Коньшьева Н. В.* Обзор антимикотических лекарственных средств, используемых для лечения инвазивных микозов у больных новой коронавирусной инфекцией COVID-19. URL: <https://dnmu.ru/wp-content/uploads/2022/05/Сидоренко-И.А.-Обзор-антимикотических-ЛС-1.pdf> (дата обращения 24.09.2024). [Sidorenko I. A., Naletov S. V., Naletova E. N., Konyshcheva N. V. Obzor antimitokicheskikh lekarstvennykh sredstv, ispol'zuemykh dlya lecheniya invazivnykh mikofov u bol'nykh novoi koronavirusnoi infektsiei COVID-19. URL: <https://dnmu.ru/wp-content/uploads/2022/05/Sidorenko-I.A.-Obzor-antimitokicheskikh-LS-1.pdf>. (in Russian)]
 38. *Сетево издание: Регистр лекарственных средств России РЛС. URL: <https://www.rlsnet.ru/> (дата обращения 29.10.2024) [Setevoe izdanie «Registr lekarstvennykh sredstv Rossii RLS» [cited 2024 Oct 29]. Available from: <https://www.rlsnet.ru/> (in Russian)]*
 39. *Веселов А. В.* Клиническая фармакология и практические аспекты применения изавуконазола. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2023; 25 (4): 379–394. [Veslov A. V. Clinical pharmacology and practical aspects of isavuconazole use. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2023; 25 (4): 379–394. (in Russian)]
 40. *Tagirova L. L., Farvazova K. R., Valeeva D. R., Orlova M. D., Gubaidullin I. A., Tulybaeva A. M. et al.* Reviewing the mechanism of action and results of clinical studies on the antifungal drug ibrexafungin. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction.* 2024; 18 (2): 232–45. <https://doi.org/10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2024.500/> (in Russian)]
 41. *Syed Y. Y.* Rezafungin: First Approval. *Drugs.* 2023; 83 (9): 833–840. doi: 10.1007/s40265-023-01891-8.
 42. *Logan A., Wolfe A., Williamson J. C.* Antifungal Resistance and the Role of New Therapeutic Agents. *Curr Infect Dis Rep.* 2022; 24 (9): 105–116. doi: 10.1007/s11908-022-00782-5.
 43. *Ортенберг Э. А.* Перспективные антимикотики для терапии инвазивных грибковых инфекций (краткий обзор литературы). Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2023; 25 (2): 165–170. [Ortenberg E. A. Perspektivnye antimikotiki dlya terapii invazivnykh gribkovykh infektsii (kratkii obzor literatury). Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2023; 25 (2): 165–170. (in Russian)]
 44. *Gow N. A. R., Johnson C., Berman J., Coste A. T., Cuomo C. A., Perlin D. S. et al.* The importance of antimicrobial resistance in medical mycology. *Nat Commun.* 2022; 13: 5352. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32249-5>.
 45. *Chen M., Hu D., Li T., Zheng D., Liao W., Xia X., Cao C.* The epidemiology and clinical characteristics of fungemia in a tertiary hospital in Southern China: A 6-Year Retrospective Study. *Mycopathologia.* 2023; 188 (4): 353–360. doi: 10.1007/s11046-023-00757-7.
 46. *Веселов А. В., Козлов П. С.* Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2016; 18 (2): 1–105. [Veslov A., Kozlov P. S. Invazivnyi kandidoz: current aspects of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention in different categories of patients (in questions and answers). *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2016; 18: 1–105. (in Russian)]
 47. *Веселов А. В.* Современное место эхинокандинов в терапии и профилактике инвазивных микозов: краткий обзор. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020; 22 (3): 197–209. [Veslov A. V. The current place of echinocandins in the treatment and prophylaxis of invasive fungal infections. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2020; 22 (3): 197–209. (in Russian)]
 48. *Pfaller M. A., Diekema D. J., Turnidge J. D., Castanheira M., Jones R. N.* Twenty years of the sentry antifungal surveillance program: results for

- Candida species* from 1997–2016. *Open Forum Infect Dis.* 2019; 6 (Suppl 1): S79–S94. doi: 10.1093/ofid/ofy358.
49. Vallabhaneni S., Cleveland A. A., Farley M. M., Harrison L. H., Schaffner W., Beldavs Z. G. et al. Epidemiology and risk factors for echinocandin non-susceptible *Candida glabrata* bloodstream infections: data from a large Multisite Population-Based Candidemia Surveillance Program, 2008–2014. *Open Forum Infect Dis.* 2015; 2 (4): ofv163. doi: 10.1093/ofid/ofv163.
 50. Chowdhary A., Prakash A., Sharma C., Kordalewska M., Kumar A., Sarma S. et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73: 891–899. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx480>.
 51. Lockhart S. R., Etienne K. A., Vallabhaneni S., Farooqi J., Chowdhary A., Govender N. P. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis.* 2017; 64: 134–40. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw691>.
 52. Беженар М. Б., Плахова К. И. Механизмы развития резистентности к противогрибковым препаратам грибов рода *Candida* при рецидивирующем течении урогенитального кандидоза. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020; 38 (1): 15–23. <https://doi.org/10.17116/molgen20203801115>. [Bezhenar M. B., Plakhova K. I. Antifungal drug resistance *Candida* spp. mechanisms in recurrent genital candidiasis. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2020; 38 (1): 15–23. <https://doi.org/10.17116/molgen20203801115>. (in Russian)]
 53. Logan A., Wolfe A., Williamson J. C. Antifungal resistance and the role of new therapeutic agents. *Curr Infect Dis Rep.* 2022; 24 (9): 105–116. doi: 10.1007/s11908-02200782-5.
 54. Wang, Q., Cai, X., Li, Y., Zhao J., Liu Z., Jiang Y. et al. Molecular identification, antifungal susceptibility, and resistance mechanisms of pathogenic yeasts from the China antifungal resistance surveillance trial (CARST-fungi) study. *Frontiers in Microbiology.* 2022; 13: 1006375. doi: 10.3389/fmicb.2022.1006375.
 55. Ahmed M. Z., Rao T., Saeed A., Mutahir Z., Hameed S., Inayat S. et al. Antifungal drugs: mechanism of action and resistance. *Biochemistry of Drug Resistance.* 2021; 5: 143–165.
 56. Gutierrez-Perez C., Puerner C., Jones J. T., Vellanki S., Vesely E. M., Xatse M. A. et al. Unsaturated fatty acid perturbation combats emerging triazole antifungal resistance in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mBio.* 2024; 15 (7): e0116624. doi: 10.1128/mbio.01166-24.
 57. Pata J., Moreno A., Wiseman B., Magnard S., Lehlali I., Dujardin M. et al. Purification and characterization of Cdr1, the drug-efflux pump conferring azole resistance in *Candida species*. *Biochimie.* 2024; 220: 167–178. doi: 10.1016/j.biochi.2023.12.007.
 58. Sen P., Vijay M., Kamboj H., Gupta L., Shankar J., Vijayaraghavan P. cyp51A mutations, protein modeling, and efflux pump gene expression reveals multifactorial complexity towards understanding *Aspergillus* section Nigri azole resistance mechanism. *Sci Rep.* 2024; 14 (1): 6156. doi: 10.1038/s41598-024-55237-9.
 59. Perlin D. S. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. *Drugs.* 2014; 74 (14): 1573–1585. doi: 10.1007/s40265-014-0286-5.
 60. Meersseman W., Lagrou K., Maertens J., Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 2007; 45 (2): 205–216. doi: 10.1086/518852.
 61. Диагностика и лечение микозов. Под ред. Д. Р. Хоспентала, М. Дж. Риналди. Пер. с англ. под ред. Ю. В. Сергеева. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013; 448. [Diagnostika i lechenie mikofov. D. R. Khospentala, M. Dzh. Rinaldi (eds.) Per. s angl. Yu. V. Sergeeva (ed.). Moscow: GEOTAR-Media. 2013; 448. (in Russian)]
 62. Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: Изд-во Бином, 2008; 480. [Sergeev A. Yu., Sergeev Yu. V. Gribovye infektsii. Rukovodstvo dlya vrachei. Moscow: Izd-vo Binom, 2008; 480. (in Russian)]
 63. Кулько А. Б. Активность *in vitro* амфотерицина В, вориконазола, итраконазола и позаконазола в отношении основных и редко встречающихся возбудителей аспергиллеза. Успехи медицинской микологии. 2017; 17: С. 333–336. [Kulko A. B. Aktivnost' *in vitro* amfoteritsina V, vorikonazola, itrakonazola i pozakonazola v otnoshenii osnovnykh i redko vstrechayushchikhsya vozбудitelei aspergilleza. *Uspehi meditsinskoj mikologii.* 2017; 17: S. 333–336. (in Russian)]
 64. van der Linden J. W.M., Arendrup M. C., Warris A., Lagrou K., Pelloux H., Hauser P. M. et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21 (6): 1041–1044. doi: 10.3201/eid2106.140717.
 65. Shishodia S.K., Tiwari S., Shankar J. Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus* species against antifungal agents. *Mycology.* 2019; 10: 151–65. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1574927>.
 66. Morogovsky A., Handelman M., Abou Kandil A., Shadkchan Y., Osheroov N. Horizontal gene transfer of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol Spectr.* 2022; 10 (3): e0111222. doi: 10.1128/spectrum.01112-22.

Поступила / Received 03.11.2024
 Принята в печать / Accepted 23.11.2024

Информация об авторах

Автономова Анастасия Витальевна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории биосинтеза биологически активных соединений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-5098-5379

Краснопольская Лариса Михайловна — д. б. н., ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией биосинтеза биологически активных соединений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0391-0339

About the authors

Anastasia V. Avtonomova — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Biosynthesis of Biologically Active Substances, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-5098-5379

Larissa M. Krasnopolskaya — D. Sc. in Biology, Leading researcher, Head of the Laboratory of Biosynthesis of Biologically Active Substances, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0391-0339

Новые возможности преодоления антибиотикорезистентности бактерий

*А. Н. ГРАЦИАНСКАЯ, Н. В. ТЕПЛОВА, Л. Б. БЕЛОУСОВА

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Пироговский Университет), Москва, Россия

Резюме

Антибиотикорезистентность остаётся одной из самых актуальных проблем в успешном лечении бактериальных заболеваний. Микроорганизмы, находящиеся в составе биоплёнок, намного быстрее и мощнее развивают устойчивость к противомикробным препаратам, чем планктонные формы. При помощи «quorum sensing» («чувство кворума») бактерии в составе биоплёнок обмениваются информацией друг с другом и максимально реализуют свою патогенность. В данном обзоре рассматриваются основные механизмы антибиотикорезистентности, строение и жизнедеятельность биоплёнок, механизмы «чувства кворума», а также возможные пути преодоления устойчивости бактерий к антибиотикам благодаря воздействию на подавление «чувства кворума».

Ключевые слова: биоплёнки; антибиотикорезистентность; чувство кворума; антимикробные пептиды; ингибиторы; моноклональные антитела

Для цитирования: Грацианская А. Н., Теплова Н. В., Белоусова Л. Б. Новые возможности преодоления антибиотикорезистентности бактерий. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 121–126. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-121-126>. EDN: NCCDAC.

New Possibilities for Overcoming Antibiotic Resistance in Bacteria

*ANNA N. GRATSIANSKAYA, NATALIA V. TEPLOVA, LUDMILA B. BELOUSOVA

Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Pirogov University), Moscow, Russia

Abstract

Antibiotic resistance remains one of the most significant barriers to successful treatment of bacterial diseases. The microorganisms present in biofilms develop antimicrobial resistance much faster and more powerfully than planktonic forms. With the help of «quorum sensing», bacteria in biofilms exchange information with each other to maximize their pathogenicity. This review examines the main mechanisms of antibiotic resistance, the structure and vital activity of biofilms, the mechanisms of the «sense of quorum», as well as possible ways to overcome antibiotic-resistant bacterial resistance due to the effect of suppressing the «sense of quorum».

Keywords: biofilms; antibiotic resistance; quorum sensing; antimicrobial peptides; inhibitors; monoclonal antibodies

For citation: Gratsianskaya A. N., Teplova N. V., Belousova L. B. New possibilities for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (11–12): 121–126. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-121-126>. EDN: NCCDAC. (in Russian)

Введение

А. Флеминг совершил огромный прорыв в лечении бактериальных заболеваний, в результате открытия антибиотиков в 1928 г. С этого времени проведено множество научных исследований, благодаря которым удалось драматически снизить риск развития летальных исходов бактериальных заболеваний [1]. Как и все живые существа, микроорганизмы, стремясь к

выживанию в природе, выработали механизмы устойчивости к воздействию антибиотиков. В настоящее время антибиотикорезистентность является одной из самых больших угроз для человечества и, по данным ВОЗ, может стать одной из ведущих причин смертности в течение последующих десятилетий [2].

Выделяют две формы антибиотикорезистентности: природную и приобретённую. Первая отражает постоянный видовой признак микроорга-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: annagrats@rambler.ru



*Correspondence to:
E-mail: annagrats@rambler.ru

низмов и заключается в отсутствии мишени действия для противомикробных препаратов. Приобретённая резистентность возникает благодаря мутациям генов или возникновением новой генетической информации. Известно несколько механизмов антибиотикорезистентности:

- 1) ферментативная инактивация антибиотика;
- 2) изменение проницаемости клеточной стенки микроорганизма;
- 3) блокирование транспорта антибиотика в бактериальные клетки;
- 4) изменение биохимической организации самой бактериальной клетки [3, 4].

Было выявлено, что устойчивость микроорганизмов развивается уже вскоре после одобрения новых препаратов [5]. Особенную трудность представляет лекарственная устойчивость бактерий в биоплёнках. Показано, что за развитие около 80% хронических и рецидивирующих бактериальных инфекций у человека отвечают микроорганизмы, находящиеся в составе биоплёнок [6]. Немаловажным фактом является развитие бактериальных биоплёнок на медицинском оборудовании, в результате которого возникают инфекции, связанные с хирургическими вмешательствами (например, эндопротезированием) [7]. Бактериями, которые всё чаще развивают устойчивость к антибиотикам являются *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. [8].

В связи с актуальностью проблемы, в предлагаемом обзоре обсуждается влияние бактериальных биоплёнок на развитие антибиотикорезистентности и имеющиеся пути решения этой проблемы.

История открытия и изучения бактериальных биоплёнок

История открытия биоплёнок началась с изучения Антони ван Левенгуком зубного налёта в 1673 г. Однако активизация исследований произошла во второй половине XX в., после вспышки в 1976 г. болезни легионеров. Подробно биоплёнку исследовал Bill Costerton. В 1978 г. им была выдвинута гипотеза «биологического выигрыша» микроорганизмом в составе таких сообществ. В 1995 г. произошло введение концепции «biofilms model» («модель биоплёнок»), которая отражает создание микроорганизмами уникальных сообществ, окружённых специальной оболочкой [9, 10].

Биоплёнки являются колонией микроорганизмов, живущих на различных органических или неорганических поверхностях и погружённых во внеклеточное полимерное вещество (слизь). Существует мнение, что около 95–99% всех микро-

организмов живёт в составе таких сообществ, в том числе в составе микробиоты человека [11].

Биоплёнки представляют собой серьёзную проблему при лечении инфекционных заболеваний, поскольку обладают чрезвычайной устойчивостью к различным видам стресса, включая воздействие антибиотиков и иммунной системы хозяина. Показано, что даже при воздействии антибиотиков в концентрациях, в 500–1000 раз превышающих минимальную подавляющую концентрацию (МПК), бактерии, находящиеся в составе биоплёнок, способны к выживанию [12]. Такое преимущество, по сравнению с планктонными формами, реализуется благодаря особенностям строения и жизнедеятельности биоплёнок и заключается в наличии тесного контакта между бактериями, внеклеточного матрикса и изоляции от внешней среды оболочкой. Биоплёнки до 97% состоят из воды, остальная часть приходится на микробные клетки (2–5%), экзополисахариды (1–2%), а также белки и нуклеиновые кислоты (<1–2%) [13].

Образование биоплёнок происходит благодаря последовательно сменяющимся стадиям. Обратимая адгезия клеток на поверхности сменяется необратимой путём выделения полимерных веществ и образования монослоя. В дальнейшем создаются микроколонии, дифференцирующиеся в зрелые биоплёнки, имеющие каналы, заполненные жидкостью, по которым диффундируют питательные вещества, необходимые для поддержания жизнедеятельности колонии [12].

Способность антибиотика проникать через бактериальную биоплёнку варьирует в зависимости от класса препарата и родов бактерий. В исследованиях R. Singh и соавт. [14] было установлено, что снижение проникновения в биоплёнках *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *Escherichia coli* ванкомицина, левомицетина, амикацина, ципрофлоксацина, имипенема, цефотаксима, тетрациклина составило 57, 34, 22, 18, 14, 11 и 9%, соответственно.

«Общение» между бактериями в биоплёнках происходит путём изменения экспрессии генов и реализуется при помощи так называемого «quorum sensing» («кворум сенсинг» или «чувство кворума»; QS) [8, 11, 13, 15–21].

«Чувство кворума»

Подробное изучение биоплёнок привело к открытию «quorum sensing» («чувство кворума»), когда в 1970-х гг. было обнаружено, что появление мерцания у светящихся морских бактерий *Vibrio fischeri* (симбионты кальмаров) и *Vibrio harveyi* возможно только в ответ на специфические индукторы при высокой плотности клеточной колонии [15].

Благодаря «чувству кворума» бактерии могут одновременно регулировать экспрессию генов факторов вирулентности и патогенности, в зависимости от плотности колонии [8, 12, 14–21].

Наиболее хорошо системы QS изучены у *P. aeruginosa* и *S. aureus* [16]. Механизм QS реализуется при помощи малых сигнальных молекул — аутоиндукторов. В качестве аутоиндукторов грам-отрицательные бактерии используют N-ацилглютамосеринлактон (AHL), являющийся ключевым эффектором систем межклеточной коммуникации грам-отрицательных бактерий, а грамположительные — короткие пептиды, которые являются продуктами гидролиза более крупных белковых предшественников. Аутоиндуктор-2 (AI-2) диэфир фуранозилбората или тетрагидроксифуран является универсальным и используется у грам-отрицательных и грамположительных бактерий, что даёт основание предполагать его роль в межвидовой коммуникации. AHL грам-отрицательных бактерий состоит из ядра N-ацилированного гомосеринового лактонного кольца и алифатической ацильной цепи, которая имеет различную длину в зависимости от вида бактерий. Во время биосинтеза жирных кислот образуется промежуточный продукт S-аденозилметионина (SAM).

Синтез AHL происходит благодаря синтазе типа LuxI, путём создания лактонного фрагмента из промежуточного продукта биосинтеза жирных кислот (SAM). Белки LuxI-типа отвечают за синтез AI-1, преимущественно 3-оксо-гексаноил-1-гомосеринового лактона (3OC₆-HSL). Аутоиндукторы имеют способность свободно перемещаться через мембрану клетки при помощи диффузии, а их концентрация в среде прямо пропорционально зависит от плотности колонии. AHL-LuxR является цитоплазматическим рецепторным белком для аутоиндукторов и одновременно является и транскрипционным регулятором. Этот регулятор в связанном состоянии с аутоиндуктором активирует транскрипцию генов, контролируемых системой QS. При наличии аутоиндукторов экспрессия генов увеличивается в 5 раз. Помимо LasR/LasI у *P. aeruginosa* существует вторая AHL-зависимая система RhlR/RhlI, ответственная за синтез AI-2, N-бутаноил-L-гомосеринлактон (C₄-AHL), который отвечает за транскрипцию генов, регулирующих образование биоплёнок. Было выявлено, что при помощи QS бактерии могут обмениваться информацией даже с неродственными видами [8, 12, 14–21].

Помимо этого, существует связь между системами LasR/LasI и RhlR/RhlI, благодаря аутоиндуктуру *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS). В результате этого микроорганизмы могут координировать синтез факторов патогенности и вирулентности. Количество генов, контролируемых QS, велико и может превышать 10% бактериального генома: на-

пример, у *P. aeruginosa* было выявлено более 40 генов, регулируемых QS [8, 12].

У грамположительных микроорганизмов аутоиндукторы представлены короткими пептидами, которые первоначально синтезируются в виде более длинных белков-предшественников. Их перенос через мембрану осуществляется благодаря специфическому АТФ-переносчику. Как только возрастёт концентрация аутоиндукторов, фермент гистидин-киназа связывается с ним, фосфорилируется, после чего происходит передача сигнала на белок регулятора ответа, благодаря которому происходит активация экспрессии генов QS [8, 12].

Подавление «чувства кворума»

Ввиду того, что QS тесно связано с образованием биоплёнки и развитием антибиотикорезистентности, подавление QS является прогрессивным методом в борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам. Подавление QS возможно реализовать используя следующие механизмы:

- 1) ингибирование синтеза AHL;
- 2) антагонизм рецепторов AHL;
- 3) ингибирование мишеней после связывания с рецепторами;
- 4) секвестрация AHL;
- 5) дегградация AHL;
- 6) ингибирование секреции и/или транспорта AHL [8].

Выделяют природные и синтетические ингибиторы QS. Природные (фенолы, фенольные кислоты, сапонины, кумарины, дубильные вещества, хиноны, терпеноиды, алкалоиды и полиацетилены) выделяют из различных фруктов и овощей. Так, экстракт апельсина, богатый гесперидином (hesperidin), неогесперидином (neohesperidin), нарингенином (naringenin) ингибировал продукцию AHL у *Y. enterocolitica* [8, 22, 23].

Синтетический QS-ингибитор норспермидин (norspermidine) эффективно снижает прикрепление *P. aeruginosa* к поверхности путём ингибирования экспрессии генов LasR, LasI, RhlR, RhlI, а также может увеличивать отрицательный заряд поверхности клетки, снижать её гидрофобность, тем самым способствуя разрушению биоплёнок [8, 24, 25].

Авторы [8, 26, 27] сообщили, что фуранон C-30 может подавлять большинство генов, ответственных за синтез факторов вирулентности, ингибировать образование биоплёнки за счёт подавления QS, влиять на ключевую лактамазу AmpC у *P. aeruginosa*.

К сожалению, несмотря на многочисленные преимущества, последние сообщения указывают на развитие устойчивости бактерий к ингибиторам QS [28, 29].

Во время изучения QS были обнаружены ферменты подавления «чувства кворума» в самих бактериальных клетках. К ним относят лактоназу, ацилазу, оксидоредуктазу.

Было показано, что лактоназа AiiA, продуцируемая *Bacillus cereus*, ингибирует образование биоплёнки и синтез факторов вирулентности пиоцианина, рамнолипида и экзополисахаридов у *P. aeruginosa* [8, 30].

Ацилазы, полученные от *Streptomyces* spp. M664 (AhlM), *Ralstonia* spp. (AiiD), *Ralstonia solanacearum* (Aac), *P. aeruginosa* (PydQ) и *Ochrabactrum* spp., показали, что AiiD и AhlM влияют на активность факторов патогенности *P. aeruginosa* путём гидролиза N-ацилгомосерин лактонного кольца [8, 31–35].

Оксидоредуктаза VriB09 снижает уровень ЗОС₆-HSL, подвижность, препятствует синтезу аутоиндукторов, факторов вирулентности у *P. aeruginosa* [8, 36].

Ещё одним предметом изучения способов подавления «чувства кворума» являются антимикробные пептиды (АМП), которые играют важную роль в механизмах врождённого иммунитета всех живых организмов. АМП могут воздействовать на клеточную стенку, клеточную мембрану, на внутриклеточные мишени, а также на модуляцию иммунной системы хозяина [8, 37].

АМП кателицидин LL-37, продуцируемый в организме человека, обладает мощной активностью против *S. aureus*. При концентрациях 1000 мкМ/л, что в 2000–4000 раз превышает МПК обычных антибиотиков, наблюдалось снижение количества колоний бактерий. В то же время, доказаны и несколько механизмов резистентности к LL-37 [8, 38–40].

J. Overhage и соавт. [41] показали, что LL-37 может подавлять 475 генов, включая те, которые контролируются QS (LasI и RhlR), то есть LL-37 подавляет, в том числе, транскрипцию генов, ответственных за синтез факторов вирулентности, подвижности, адгезии, развития биоплёнки и модуляции иммунных реакций хозяина.

АМП зарекомендовали себя как мощный инструмент в борьбе с бактериальными биоплёнками, однако были выявлены случаи приобретения АМП-резистентности бактерий, а некоторые АМП проявляли системную токсичность [42, 43].

В последнее время идёт активное изучение возможности подавления «чувства кворума» при помощи моноклональных антител [11, 44, 45].

В исследовании L. Martyn и соавт. [44] изучалась предварительная обработка материалов имплантатов синусовых пазух антителами. Результаты продемонстрировали предотвращение образования биоплёнки.

Авторы [8, 45] продемонстрировали, что человеческое моноклональное антитело TRL068, свя-

зываясь с белками DNABII, нарушает образование биоплёнки *S. aureus* и *P. aeruginosa*, что, в свою очередь, приводит к выведению патогена иммунными факторами хозяина или антибиотиками.

Хотя большинство исследований ещё находятся в стадии разработки, уже понятно, что использование моноклональных антител в дополнение к антибиотикотерапии может стать успешной стратегией лечения инфекций, связанных с биоплёнками [46].

Заключение

На сегодняшний день проблема антибиотикорезистентности остаётся открытой и с каждым годом приобретает всё новые масштабы.

Образование бактериальных биоплёнок является одной из основных причин устойчивости бактерий к антибиотикам. В составе такого сообщества микроорганизмы максимально реализуют свой болезнетворный потенциал. Учитывая важную роль «чувства кворума» в образовании биоплёнки, его подавление является перспективной стратегией преодоления антибиотикорезистентности и лечения бактериальных инфекций.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией. *Грацианская А. Н.* — разработка концепции и плана работы, анализ данных литературы, написание текста рукописи; *Теплова Н. В.* — разработка концепции работы, написание текста рукописи, финальное утверждение рукописи; *Белоусова Л. Б.* — анализ данных литературы, написание текста рукописи.

Additional information

Conflict of interests. The authors state that there is no conflict of interest.

Authors' participation. All the authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication. *Gratsianskaya A. N.* — development of the concept and plan of the work, analysis of literary data, writing the manuscript; *Teplova N. V.* — development of the concept of the work, writing the manuscript, final approval of the manuscript; *Belousova L. B.* — analysis of literary data, writing the manuscript.

Financing. The work was carried out without sponsorship.

Литература/References

1. Панков А. А., Медведева К. А. Пенициллин, его значение в медицине. Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2016; 1: 175. [Pan-
kov A. A., Medvedeva K. A. Penicillin, its importance in medicine. Bulletin
of Medical Internet Conferences. 2016; 1: 175. (in Russian)]
2. Pulingam T., Parumasivam T., Gazzali A. M., Sulaiman A. M., Chee J. Y.,
Lakshmanan M., Chin C. F., Sudesh K. Antimicrobial resistance: Prevalence,
economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome.
Eur J Pharm Sci. 2022 Mar 1; 170: 106103. doi: 10.1016/j.ejps.2021.106103.
3. Сидоренко С. В., Тишков В. И. Молекулярные основы резистентности
к антибиотикам. Успехи биологической химии. 2004; 44: 263–306.
[Sidorenko S. V., Tishkov V. I. Molecular bases of resistance to antibiotics.
Advances in Biological Chemistry. 2004; 44: 263–306. (in Russian)]
4. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии.
Под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. Смол-
еск: Межрегиональная ассоциация по клинической микробиоло-
гии и антимикробной химиотерапии, 2007; 462. ISBN 5-86064-
115-X. [Practical guide to anti-infective chemotherapy / edited by L. S. Stra-
chunsky, Yu. B. Belousov, S. N. Kozlov. Smolensk: Interregional Association
for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 2007; 462.
ISBN 5-86064-115-X. (in Russian)]
5. Морозов А. М., Жуков С. В., Ковальчук Ю. И., Ноженко Е. Н., Мина-
кова Ю. Е. О проблемах борьбы с антибиотикорезистентностью (обзор
литературы). Вестник новых медицинских технологий. Электронное
издание. 2022; 16 (2): 98–105. doi: <https://doi.org/10.24412/2075-4094-2022-2-3-2>. [Morozov A. M., Zhukov S. V., Kovalchuk Yu. I., Nozhenko E. N.,
Minakova Yu. E. On the problems of combating antibiotic resistance (litera-
ture review). Bulletin of new medical technologies. Electronic Pub-
lication. 2022; 16 (2): 98–105. doi: <https://doi.org/10.24412/2075-4094-2022-2-3-2>. (in Russian)]
6. Sharma D., Misba L., Khan A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging
battleground in microbial communities. Antimicrob Resist Infect Control.
2019 May 16; 8: 76. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3.
7. Петухова И. Н., Соколовский А. В., Григорьевская З. В., Багирова Н. С.,
Тереженко И. В., Варлан Г. В., Азинова В. В., Дмитриева Н. В. Ин-
фекции, связанные с установкой инородных материалов (протезы,
сетки, импланты). Злокачественные опухоли. 2017; (3s1): 57–60.
doi: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2017-3s1-57-60>. [Petukhova I. N.,
Sokolovskiy A. V., Grigoryevskaya Z. V., Bagirova N. S., Tereshchenko I. V.,
Varlan G. V., Aginova V. V., Dmitrieva N. V. Infections associated with the
installation of foreign materials (prostheses, meshes, implants). Malignant
Tumours. 2017; (3s1): 57–60. doi: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2017-3s1-57-60>. (in Russian)]
8. Juszczuk-Kubiak E. Molecular aspects of the functioning of pathogenic
bacteria biofilm based on quorum sensing (QS) signal-response system
and innovative non-antibiotic strategies for their elimination. Int J Mol
Sci. 2024 Feb 24; 25 (5): 2655. doi: 10.3390/ijms25052655.
9. Lappin-Scott H., Burton S., Stoodley P. Revealing a world of biofilms —
the pioneering research of Bill Costerton. Nat Rev Microbiol. 2014 Nov;
12 (11): 781–787. doi: 10.1038/nrmicro3343.
10. Stoodley P., Boyle J. D., Dodds I., Lappin-Scott H. M. Consensus model of
biofilm structure. In: Wimpenny J. W. T., Handley P. S., Gilbert P., Lap-
pin-Scott H. M. and Jones M. (eds.) Biofilms: Community Interactions
and Control: 3rd meeting of the Biofilm Club. 1997; 1–9.
11. Thi M. T. T., Wibowo D., Rehm B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms.
Int J Mol Sci. 2020 Nov 17; 21 (22): 8671. doi: 10.3390/ijms21228671.
12. Петухова И. Н., Дмитриева Н. В., Григорьевская З. В., Багирова Н. С.,
Тереженко И. В. Инфекции, связанные с образованием биопленок.
Злокачественные опухоли. 2019; 9 (3s1): 26–31. doi: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2019-9-3s1-26-31>. [Petukhova I. N.,
Dmitrieva N. V., Grigoryevskaya Z. V., Bagirova N. S., Tereshchenko I. V. Infections associated
with biofilm formation. Malignant Tumours. 2019; 9 (3s1): 26–31. doi:
<https://doi.org/10.18027/2224-5057-2019-9-3s1-26-31>. (in Russian)]
13. Ларюшина И. Э. Основные механизмы «чувства кворума» и их реал-
изация в мультимикробном сообществе (обзор). Животноводство
и кормопроизводство. 2020; 103 (4): 160–173. doi: <https://doi.org/10.33284/2658-3135-103-4-160>. [Laryushina I. E. Basic mechanisms of
«quorum sensing» and their implementation in a multimicrobial community
(review). Animal Husbandry and Fodder Production. 2020; 103 (4): 160–173.
doi: <https://doi.org/10.33284/2658-3135-103-4-160>. (in Russian)]
14. Singh R., Sahore S., Kaur P., Rani A., Ray P. Penetration barrier contributes
to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics,
and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. Pathog
Dis. 2016 Aug; 74 (6): ftw056. doi: 10.1093/femspd/ftw056.
15. Пучков Е. О. Общение микробов. Химия и жизнь. 2015; 12: 28.
[Puchkov E. O. Communication of microbes. Chemistry and Life. 2015;
12: 28. (in Russian)]
16. Deng Z., Luo X. M., Liu J., Wang H. Quorum Sensing, Biofilm, and
Intestinal Mucosal Barrier: Involvement the Role of Probiotic. Front
Cell Infect Microbiol. 2020 Sep 25; 10: 538077. doi: 10.3389/fcimb.2020.
538077.
17. Smith P., Schuster M. Antiactivators prevent self-sensing in *Pseudomonas*
aeruginosa quorum sensing. Proc Natl Acad Sci U. S.A. 2022 Jun 21; 119
(25): e2201242119. doi: 10.1073/pnas.2201242119.
18. Su Y., Ding T. Targeting microbial quorum sensing: the next frontier to
hinder bacterial driven gastrointestinal infections. Gut Microbes. 2023
Dec; 15 (2): 2252780. doi: 10.1080/19490976.2023.2252780.
19. Azimi S., Klementiev A. D., Whiteley M., Diggle S. P. Bacterial Quorum
Sensing During Infection. Annu Rev Microbiol. 2020 Sep 8; 74: 201–219.
doi: 10.1146/annurev-micro-032020-093845.
20. Хмель И. А., Белик А. С., Зайцева Ю. В., Данилова Н. Н. Quorum
sensing и коммуникация бактерий. Вестник Московского универ-
ситета. Серия 16. Биология. 2008; (1): 28–35. [Khmel I. A., Belik A. S.,
Zaitseva U. V., Danilova N. N. Quorum sensing and communication of
bacteria. Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 16. Biologiya. 2008;
(1): 28–35. (in Russian)]
21. Zeng X., Zou Y., Zheng J., Qiu S., Liu L., Wei C. Quorum sensing-mediated
microbial interactions: Mechanisms, applications, challenges and per-
spectives. Microbiol Res. 2023 Aug; 273: 127414. doi: 10.1016/j.micres.2023.
127414.
22. Vikram A., Jayaprakasha G. K., Jesudhasan P. R., Pillai S. D., Patil B. S.
Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type
III secretion system by citrus flavonoids. J Appl Microbiol. 2010 Aug;
109 (2): 515–527. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x.
23. Qu L., She P., Wang Y., Liu F., Zhang D., Chen L. et al. Effects of norsper-
midine on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication.
Microbiologyopen. 2016 Jun; 5 (3): 402–412. doi: 10.1002/mbo3.338.
24. Paluch E., Rewak-Soroczyńska J., Jędrusik I., Mazurkiewicz E., Jermakow K.
Prevention of biofilm formation by quorum quenching. Appl Microbiol
Biotechnol. 2020 Mar; 104 (5): 1871–1881. doi: 10.1007/s00253-020-
10349-w. Epub 2020 Jan 11.
25. Cardile A. P., Woodbury R. L., Sanchez C. J. Jr., Becerra S. C., Garcia R. A.,
Mende K. et al. Activity of norspermidine on bacterial biofilms of multi-
drug-resistant clinical isolates associated with persistent extremity
wound infections. Adv Exp Med Biol. 2017; 973: 53–70. doi: 10.1007/
5584_2016_93.
26. Zhao J., Cheng W., He X., Liu Y., Li J., Sun J. et al. Association of furanone
C-30 with biofilm formation & antibiotic resistance in *Pseudomonas*
aeruginosa. Indian J Med Res. 2018 Apr; 147 (4): 400–406. doi: 10.4103/
ijmr.IJMR_2010_16.
27. Hentzer M., Wu H., Andersen J. B., Riedel K., Rasmussen T. B., Bagge N. et
al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing
inhibitors. EMBO J. 2003; 22: 3803–15. doi: 10.1093/emboj/CDG366.
28. Maeda T., Garcia-Contreras R., Pu M., Sheng L., Garcia L. R., Tomás M. et
al. Quorum quenching quandary: resistance to antiviral compounds.
ISME J. 2011; 6: 493–501. doi: 10.1038/ismej.2011.122.
29. Kalia V. C., Wood T. K., Kumar P. Evolution of resistance to quorum sensing
inhibitors. Microb Ecol. 2014; 68: 13–23. doi: 10.1007/s00248-013-0316-y.
30. Rajesh P. S., Rai V. R. Inhibition of QS-regulated virulence factors in
Pseudomonas aeruginosa PAO1 and *Pectobacterium carotovorum* by
AHL-lactonase of endophytic bacterium *Bacillus cereus* VT96. Biocatal.
Agric. Biotechnol. 2016; 7: 154–163. doi: 10.1016/j.cbab.2016.06.003.
31. Kusada H., Tamaki H., Kamagata Y., Hanada S., Kimura N. A novel quo-
rum-quenching n-acylhomoserine lactone acylase from *Acidovorax* sp.
strain MR-S7 mediates antibiotic resistance. Appl Environ Microbiol.
2017 Jun 16; 83 (13): e00080–17. doi: 10.1128/AEM.00080-17.
32. Utari P. D., Setroikromo R., Melgert B. N., Quax W. J. PvdQ quorum
quenching acylase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a
mouse model of pulmonary infection. Front Cell Infect Microbiol. 2018
Apr 26; 8: 119. doi: 10.3389/fcimb.2018.00119.
33. Czajkowski R., Krzyżanowska D., Karcewska J., Atkinson S., Przystawa J.,
Lojowska E. et al. Inactivation of AHLs by *Ochrobactrum* sp. A44
depends on the activity of a novel class of AHL acylase. Environ Microbiol
Rep. 2011 Feb; 3 (1): 59–68. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00188.x.
34. Park J., Jagasia R., Kaufmann G. F., Mathison J. C., Ruiz D. I., Moss J. A. et
al. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing
signaling. Chem Biol. 2007 Oct; 14 (10): 1119–1127. doi:
10.1016/j.chembiol.2007.08.013.
35. Lin Y. H., Xu J. L., Hu J., Wang L. H., Ong S. L., Leadbetter J. R. et al. Acyl-
homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a
novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Mol Microbiol.
2003 Feb; 47 (3): 189–60. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03351.x.
36. Bijtenhoorn P., Mayerhofer H., Müller-Dieckmann J., Uptatel C., Schipper C.,
Hornung C. et al. A novel metagenomic short-chain dehydrogenase/re-
ductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and

- virulence on *Caenorhabditis elegans*. PLoS One. 2011; 6 (10): e26278. doi: 10.1371/journal.pone.0026278.
37. Иксанова А. М., Арзуманян В. Г., Конаныхина С. Ю. и др. Антимикробные пептиды и белки в биожидкостях человека. Microbiology independent research journal (MIR journal). 2022; 9 (1): 37–55. doi: <https://10.18527/2500-2236-2022-9-1-37-55.ru>. [Iksanova A. M., Arzumanyan V. G., Konanykhina S. Yu. et al. Antimicrobial peptides and proteins in human biofluids. Microbiology Independent Research Journal (MIR Journal). 2022; 9 (1): 37–55. doi: <https://10.18527/2500-2236-2022-9-1-37-55.ru>. (in Russian)]
 38. Wei J., Cao X., Qian J., Liu Z., Wang X., Su Q. et al. Evaluation of antimicrobial peptide LL-37 for treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium plate. Medicine (Baltimore). 2021 Nov 5; 100 (44): e27426. doi: 10.1097/MD.00000000000027426.
 39. Ridyard K. E., Overhage J. The potential of human peptide LL-37 as an antimicrobial and anti-biofilm agent. Antibiotics (Basel). 2021 May 29; 10 (6): 650. doi: 10.3390/antibiotics10060650.
 40. Kang J., Dietz M. J., Li B. Antimicrobial peptide LL-37 is bactericidal against *Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS One. 2019 Jun 6; 14 (6): e0216676. doi: 10.1371/journal.pone.0216676.
 41. Overhage J., Campisano A., Bains M., Torfs E. C., Rehm B. H., Hancock R. E. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. Infect Immun. 2008 Sep; 76 (9): 4176–82. doi: 10.1128/IAI.00318-08.
 42. Andersson D. I., Hughes D., Kubicek-Sutherland J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. Drug Resist Updat. 2016 May; 26: 43–57. doi: 10.1016/j.drug.2016.04.002.
 43. Batoni G., Maisetta G., Esin S. Therapeutic potential of antimicrobial peptides in polymicrobial biofilm-associated infections. Int J Mol Sci. 2021 Jan 6; 22 (2): 482. doi: 10.3390/ijms22020482.
 44. Martyn L., Sethia R., Chon R., Novotny L., Goodman S. D., Elmaraghy C. et al. Antibodies against the DNABII protein integration host factor (IHF) inhibit sinus implant biofilms. Laryngoscope. 2020 Jun; 130 (6): 1364–1371. doi: 10.1002/lary.28188.
 45. Estellés A., Woischnig A. K., Liu K., Stephenson R., Lomongsod E., Nguyen D., Zhang J., Heidecker M., Yang Y., Simon R. J., Tenorio E., Ellsworth S., Leighton A., Ryser S., Gremmelmaier N. K., Kauvar L. M. A high-affinity native human antibody disrupts biofilm from *Staphylococcus aureus* bacteria and potentiates antibiotic efficacy in a mouse implant infection model. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Mar 25; 60 (4): 2292–2301. doi: 10.1128/AAC.02588-15.
 46. Андрияков Б. Г., Недашковская Е. П. Вступая в пост-антибиотиковую эру: перспективные стратегии поиска новых альтернативных стратегий борьбы с инфекционными заболеваниями. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2018; 3 (75): 36–50. [Andryukov B. G., Nedashkovskaya E. P. Entering the post-antibiotic era: promising strategies for finding new alternative strategies to combat infectious diseases. Health. Medical ecology. Science. 2018; 3 (75): 36–50. (in Russian)]

Поступила / Received 20.11.2024
Принята в печать / Accepted 30.11.2024

Информация об авторах

Грацианская Анна Николаевна — к. м. н., доцент кафедры клинической фармакологии им. Ю. Б. Белоусова ИКМ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0876-8973. РИНЦ SPIN-код: 9025-3037

Теплова Наталья Вадимовна — д. м. н., профессор, зав. кафедрой клинической фармакологии им. Ю. Б. Белоусова ИКМ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-4259-0945. РИНЦ SPIN-код: 9056-1948

Белоусова Людмила Борисовна — студент 6 курса педиатрического факультета; лаборант кафедры клинической фармакологии им. Ю. Б. Белоусова ИКМ ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Пироговский Университет), Москва, Россия. ORCID ID: 0009-0007-9130-3267

About the authors

Anna N. Gratsianskaya — Ph. D. in Medicine, Associate Professor, Department of Clinical Pharmacology named after Yu. B. Belousov, Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0876-8973. RSCI SPIN-code: 9025-3037

Natalia V. Teplova — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology named after Yu. B. Belousov, Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-4259-0945. RSCI SPIN-code: 9056-1948

Ljudmila B. Belousova — 6th year student of the Pediatric Faculty; Laboratory Assistant at the Department of Clinical Pharmacology named after Yu. B. Belousov, Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0009-0007-9130-3267

Коморбидные инфекции при спондилоартритах: современное состояние проблемы

*М. М. БАРАНОВА, Н. В. МУРАВЬЕВА, Б. С. БЕЛОВ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия

Резюме

Коморбидные инфекции (КИ) при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях (ИВРЗ) связаны со значительной заболеваемостью и смертностью и, кроме того, сопряжены со значительными затратами в системе здравоохранения из-за необходимости дополнительного лечения и госпитализации. Развитие КИ требует временной отмены проводимой иммуносупрессивной терапии, что может приводить к обострению ИВРЗ. Существует тесная взаимосвязь между ИВРЗ и риском возникновения КИ. Причины этого многофакторны и связаны как непосредственно с самим заболеванием, так и с проводимой терапией. Особый интерес представляет изучение частоты, структуры и факторов риска КИ у больных спондилоартритами (SpA), в частности, анкилозирующим спондилитом (АС) и псориатическим артритом (ПсА), особенно в аспекте нарастающего использования генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП) и таргетных синтетических базисных противовоспалительных препаратов (тсБПВП), а также противоречивых в некоторой степени данных литературы.

Ключевые слова: коморбидные инфекции; спондилоартрит; анкилозирующий спондилит; псориатический артрит; генно-инженерные биологические препараты

Для цитирования: Баранова М. М., Муравьева Н. В., Белов Б. С. Коморбидные инфекции при спондилоартритах: современное состояние проблемы. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (11–12): 127–135. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-127-135>. EDN: NGHLKV.

Comorbid Infections in Spondyloarthritis: the Current State of the Problem

*MARINA M. BARANOVA, NATALIA V. MURAVYEVA, BORIS S. BELOV

V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia

Abstract

Comorbid infections (CI) in immuno-inflammatory rheumatic diseases (IIRDs) are associated with significant morbidity and mortality and, in addition, involve significant costs in the health care system due to the need for additional treatment and hospitalization. The development of CI requires the temporary cancellation of ongoing immunosuppressive therapy, which can lead to an exacerbation of IIRD. High activity of rheumatic disease and treatment with immunosuppressive drugs may increase the risk of CI. Of particular interest is the study of the frequency, structure and risk factors in patients with spondyloarthritis (SpA) — ankylosing spondylitis (AS) and psoriatic arthritis (PsA), especially in the aspect of the increasing use of biologics or targeted (b/tsDMARD) modifying disease agents and contradictory literature data.

Keywords: Comorbid infections; spondyloarthritis; ankylosing spondylitis; psoriatic arthritis; biologics modifying disease agents

For citation: Baranova Marina M., Muravyeva Natalia V., Belov Boris S. Comorbid infections in spondyloarthritis: the current state of the problem. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (11–12): 127–135. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-11-12-127-135>. EDN: NGHLKV. (in Russian)

Введение

Спондилоартриты — группа хронических воспалительных заболеваний позвоночника, суставов, энтезисов, характеризующаяся общими клиническими, рентгенологическими и генетическими особенностями. Согласно современной номенклатуре, данная группа заболеваний вклю-

чает АС, ПсА, спондилоартрит, ассоциированный с воспалительным заболеванием кишечника (SpA, ассоциированный с ВЗК), реактивный артрит, аксиальный (аксSpA) и периферический спондилоартриты, соответствующие классификационным критериям Международной экспертной группы по изучению спондилоартритов (Assessment of SpondyloArthritis International So-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: baranovamarina103@gmail.com



*Correspondence to:
E-mail: baranovamarina103@gmail.com

ciety, ASAS) [1]. Применение терапии, включающей ГИБП, способно модифицировать течение заболевания (замедлить рентгенологическое прогрессирование), особенно среди пациентов с ранней стадией СпА [2, 3]. Вышеуказанные аспекты способствовали широкому внедрению терапии ГИБП у больных АС и ПсА, однако в неразрывной связи с эффективностью находятся вопросы безопасности терапии, в том числе риск развития потенциально смертельных инфекционных заболеваний. КИ являются известным нежелательным явлением (НЯ), которое обусловлено механизмом действия различных противоревматических препаратов на процесс воспаления при ИВРЗ, и в абсолютном большинстве случаев требует прекращения применения последних до момента излечения от инфекции, что повышает вероятность обострения ИВРЗ. Инфекционные НЯ, развивающиеся на фоне терапии, принято разделять на серьёзные коморбидные инфекции (СКИ), под которыми обычно подразумеваются КИ, опасные для жизни, требующие внутривенного введения антибиотиков и/или госпитализации, и несерьёзные КИ. Хотя несерьёзные КИ не представляют непосредственной угрозы для жизни, их возникновение также может быть причиной нарушения режима лечения и, как следствие, обострения ревматического заболевания [4, 5].

Проблеме КИ у больных СпА, получающих современную противоревматическую терапию, будет посвящена настоящая статья.

Частота СКИ у больных СпА на фоне терапии ГИБП

Источник	Когорта больных	Препарат	Частота СКИ на 100 пациенто-лет (95% доверительный интервал — ДИ)
Atzeni F. и соавт. [7]	СпА, $n=3321$	иФНО- α	4,4 (39,6–48,4)
Burmester G. R. соавт. [8]	АС, $n=2026$	АДА	1,8
	ПсА, $n=837$	АДА	2,8
Aureal M. и соавт. [9]	СпА (ПсА, АС, аксСпА), $n=33892$	иФНО- α	ПсА 1,36 (0,72–2,16) АС, аксСпА 1,24 (0,78–1,77)
		иИЛ-17	ПсА 0,97 (0,49–1,57) АС, аксСпА 1,20 (0,59–1,96)
		иИЛ-12/23	ПсА 0,29 (0,00–1,03)
Deodhar A. и соавт. [10]	ПсА, $n=1380$	СЕК	1,9 (1,5–2,4)
	АС, $n=794$	СЕК	1,2 (0,8–1,8)
Combe B. соавт. [11]	ПсА, $n=1118$	ИКСЕ	1,3 (0,8–1,9)
Ghosh S. и соавт. [12]	ПсА, $n=1018$	УСТ	0,9
Ritchlin C. T. и соавт. [13]	ПсА, $n=4315$	УСТ	1,0
		ЭТЦ	2,58
		АДА	1,99
		ИНФ	2,12
		УСТ	2,0 (1,1–3,3)
Li X. и соавт. [14]	ПсА, $n=1869$	иФНО- α	2,7 (2,1–3,3)
		иИЛ-17	2,3 (1,3–3,7)

Примечание. иИЛ-17 — ингибиторы интерлейкина-17; иИЛ-12/23 — ингибиторы интерлейкинов 12/23; СЕК — секукинумаб; ИКСЕ — иксекизумаб; УСТ — устекинумаб.

Note.

Ингибиторы фактора некроза опухоли α (иФНО- α)

К препаратам, блокирующим ФНО- α , относят моноклональные антитела инфликсимаб (ИНФ), адалимумаб (АДА), голимумаб (ГЛМ), цертолизумаба пегол (ЦП), а также растворимый рецептор ФНО- α этанерцепт (ЭТЦ). Согласно данным литературы, все препараты этой группы обладают сходной эффективностью в отношении основных проявлений СпА (спондилит, артрит и энтезит) на разных стадиях заболевания, что способствует их широкому применению в терапии этих больных [6].

Сводная частота СКИ у больных СпА на фоне терапии иФНО- α , а также другими ГИБП отражена в таблице.

В метаанализе РКИ, выполненном французскими учёными, относительный риск (ОР) для КИ при применении иФНО- α у больных СпА составил 1,23 (95% ДИ 1,11–1,37) [15].

По данным национального итальянского регистра GISEA, в течение года после инициации терапии иФНО- α развитие СКИ документировано у 32% пациентов. Ведущей локализацией СКИ были нижние дыхательные пути (НДП) и кожа. Бактериальные инфекции составили 58,3%, грибковые — 10,2%, вирусные (включая герпес-зостер — HZ) — 5,6% (среди случаев СКИ с установленным этиологическим агентом). Коморбидные состояния ($p<0,001$), возраст на момент начала терапии иФНО- α ($p=0,03$), лечение глюкокортикоидами (ГК)

($p=0,012$) и мужской пол ($p=0,012$) были факторами, связанными с развитием СКИ [7].

По данным L. Quartuccio и соавт. [16], наиболее частыми СКИ у пациентов с ИВРЗ, получающих терапию ГИБП (у 91,5% больных проводилась терапия иФНО- α), были инфекции ДП, зарегистрированные с частотой 53,5%, 35,4% и 37,5% у больных ревматоидным артритом (РА), ПсА/псориазом (ПсО) и АС соответственно, тогда как инфекции ЖКТ, включая анально-ректальный абсцесс и перитонит, встречались чаще у больных ПсА/ПсО и АС (20 и 25% соответственно), чем при РА (14%). Инфекции кожи и мягких тканей, а также герпес-вирусные инфекции, отсутствовали в структуре СКИ у пациентов с АС, однако чаще встречались при ПсА/ПсО (7,7 и 3,1%), чем у больных РА (6,5 и 3%). Факторами, связанными с риском развития СКИ, были возраст >65 лет (ОР 4,21, 95% ДИ 2,74–6,46; $p<0,0001$), индекс коморбидности Чарльсона (ОР 1,35, 95% ДИ 1,19–1,52; $p<0,0001$), ежегодное количество назначений синтетических базисных противовоспалительных препаратов — сБПВП (ОР 1,08, 95% ДИ 1,05–1,12; $p<0,0001$).

Согласно данным одномоментного ретроспективного исследования, проведённого в ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой на когорте из 332 больных СпА, приём ГИБП в целом и иФНО- α в частности являлись предикторами развития инфекций НДП (отношение шансов — ОШ 2,018 и 2,376 для ГИБП и иФНО- α , соответственно; $p<0,01$), ЛОР-органов (ОШ 1,761 и ОШ 1,833; $p<0,02$), а также СКИ в целом (ОШ 1,941 и ОШ 2,246; $p<0,01$) [17].

Практически любой ГИБП (в большей или меньшей степени) может приводить к развитию туберкулёза (ТБ). Особенно это характерно для иФНО- α . S. K. Lee и соавт. [18] показали, что у больных ИВРЗ ($n=509$), в том числе АС (27,9%), получавших иФНО- α , риск развития ТБ нарастал в 6,4 раза по сравнению с популяцией в целом (после поправки на возраст и пол). По данным анализа 19 РКИ с участием 8320 больных ИВРЗ (РА, ПсА, АС), выполненном G. Murdaca и соавт. [19], частота ТБ в группе лечения иФНО- α составила 0,6%, что было равноценно трёхкратному нарастанию риска развития ТБ на фоне приёма иФНО- α по сравнению с группой контроля. Сходные данные получены турецкими авторами в ходе сравнения частоты развития ТБ среди больных ИВРЗ, получающих терапию иФНО- α и без таковой. При этом риск развития ТБ среди пациентов, леченных иФНО- α , был выше у мужчин (ОР 5,39, 95% ДИ 1,69–7,17), пациентов с РА (ОР 5,70, 95% ДИ 1,41–23,08) и ПсА (ОР 13,46, 95% ДИ 1,58–114,40) [20].

Особого внимания заслуживает проблема безопасности терапии иФНО- α у пациентов с вирусными гепатитами В (ВГВ) и С (ВГС). По данным метаанализа, выполненного T. C. Lin и соавт. [21],

частота реактивации ВГВ среди всех подгрупп воспалительных артропатий (РА, АС, ПсА) была низкой (1,6%) и значимо не отличалась в зависимости от проводимой терапии (ГИБП или сБПВП). Однако в другом обзоре частота реактивации ВГВ у больных АС с неактивным носительством, получающих иФНО- α , достигала 16,6% [22]. Тем не менее, в обеих работах подчёркивается значительное нарастание риска обострения хронического ВГВ на фоне проводимой иммуносупрессивной терапии, в том числе иФНО- α , особенно при отсутствии специфической профилактики. Большинство имеющихся в литературе данных об обострении ВГС на фоне терапии иФНО- α получено в исследованиях с участием пациентов с РА и ПсА [23]. В частности, K. W. Hagberg и соавт. [24], проанализировав большую когорту больных ПсО и ПсА ($n=131604$), леченных иФНО- α как в виде монотерапии, так и в сочетании с сБПВП и/или ГК, выявили низкую частоту развития или реактивации гепатита С — 0,6 на 1000 пациенто-лет, в то время как для больных АС аналогичные по мощности исследования отсутствуют.

Ингибиторы интерлейкина 17 (иИЛ-17)

В последние годы активно внедряются в клиническую практику иИЛ-17, к которым относят секукинумаб (СЕК), иксекизумаб (ИКСЕ), нетакимаб (НТК), бродалумаб (БРД) и бимекизумаб. В целом данные РКИ демонстрируют благоприятный профиль безопасности иИЛ-17 у больных СпА, за исключением нарастания частоты КИ лёгкой и средней степени тяжести, в первую очередь острого назофарингита [25–27]. В частности, по данным метаанализа РКИ, выполненного P. Wang и соавт. [26], приём СЕК повышал риск развития острого назофарингита в 1,84 раза, приём ИКСЕ — в 1,39 раза по сравнению с плацебо. В ходе РКИ III фазы PATERA в течение первых 24 нед. были зарегистрированы два случая инфекций ВДП (в группе лечения НТК и без НТК в контроле) и один случай латентного ТБ, подтверждённого положительным тестом T-SPOT, в группе лечения НТК. Пациенту с ТБ была назначена терапия изониазидом и пиразинамидом, в дальнейшем признаков реактивации ТБ не наблюдалось [28]. По результатам 3-летнего наблюдения за пациентами, КИ были одними из наиболее частых НЯ среди пациентов, получавших НТК. Чаще всего сообщалось об инфекции ДП различной этиологии ($n=25$, 12,9%), несколько реже — о COVID-19 ($n=19$, 9,8%). Активный ТБ не зарегистрирован [29].

ИЛ-17 имеет важное значение для формирования иммунной защиты макроорганизма (в первую очередь кожи и слизистых оболочек) от *Candida albicans*. Следовательно, применение иИЛ-17

может повлечь за собой увеличение числа кандидозных инфекций. В РКИ FUTURE 2, включавшем 397 больных ПсА, кандидоз диагностирован в 11 (3,7%) наблюдениях только в группе СЕК [30]. Согласно систематическому обзору опубликованных РКИ с участием пациентов с ПсО и ПсА, кандидозы были зарегистрированы у 4% больных, получавших БРД, 1,7% — СЕК и 3,3% — ИКСЕ, а в группах сравнения — у 0,3%, 2,3% и 0,8% пациентов, получавших плацебо, устекинумаб (УСТ) или ЭТЦ соответственно [31]. Кандидоз на фоне лечения иИЛ-17 не отличался тяжёлым течением и полностью регрессировал спонтанно или в результате применения противогрибковых препаратов [26, 30, 31]. Вместе с тем, рядом авторов рекомендуется предварительный скрининг на *Candida* spp. и при необходимости проведение курсового лечения местными или системными противогрибковыми препаратами при планировании терапии иИЛ-17 [31, 32].

Ингибиторы интерлейкинов 12/23 (иИЛ 12/23)

Устекинумаб — препарат человеческих моноклональных антител к ИЛ12/23. В исследовании PSUMMIT 1 частота СКИ у больных ПсА на фоне терапии УСТ составила 0,8%, в PSUMMIT 2 — 0,96%, что было сопоставимо с контрольными группами [33]. Согласно интегрированному анализу безопасности, выполненному по данным 12 регистрационных исследований II и III фазы с продолжительностью наблюдения до 1 года, значимых отличий в частоте КИ из расчёта на 100 пациенто-лет между больными, принимающими УСТ (125,4, 95% ДИ 122,2–128,7) и группой плацебо (129,4, 95% ДИ 120,9–138,3) выявлено не было. Большинство КИ, развившихся на фоне приёма УСТ в рамках РКИ, были ограничены ДП. Оппортунистические инфекции были редкостью и включали кандидоз пищевода — 3 случая, ТБ, диссеминированный гистоплазмоз, листериозный менингит и НЗ — по 1 случаю каждый [12].

Гуселькумаб (ГУС) — человеческое моноклональное антитело, которое специфически ингибирует ИЛ-23 путём связывания с p19 субъединицей. В исследовании III фазы DISCOVER-2 оценивалась эффективность и безопасность терапии ГУС у больных ПсА ($n=741$) по сравнению с плацебо. В течение 6 мес. терапии было зафиксировано 5 случаев СКИ, 4 из которых имели место в группе терапии ГУС [34]. Долгосрочный анализ безопасности продемонстрировал низкую частоту СКИ у пациентов с ПсА, получающих терапию ГУС [35].

По данным K. W. Hagberg и соавт. [24], у больных ПсА и ПсО на монотерапии иИЛ (в том числе ИЛ-17, ИЛ-12/23) НЗ развивается реже по

сравнению с пациентами на монотерапии иФНО- α : 6,7 на 1000 пациенто-лет против 9,4 на 1000 пациенто-лет. При этом терапия сБПВП и/или ГК при комбинации с иИЛ увеличивает частоту НЗ до 10,3 на 1000 пациенто-лет, при комбинированном лечении с использованием иФНО- α — до 11,9 на 1000 пациенто-лет.

В целом результаты многочисленных исследований свидетельствуют о низкой частоте СКИ на фоне терапии иИЛ 12/23. Так, в метаанализе M. Auzan и соавт. [9] частота СКИ среди пациентов с ПсА, получавших терапию иИЛ 12/23 была в 3 раза ниже аналогичного показателя в группе терапии иИЛ-17 и в 5 раз в группах терапии иФНО- α и тсБПВП.

В литературе имеется описание случаев развития ТБ на фоне лечения иИЛ-17 [25] и иИЛ-12/23 [12]. Вместе с тем отмечается низкая частота развития ТБ у больных ПсО и ПсА, получавших эти группы препаратов [24]. Тем не менее, согласно современным отечественным рекомендациям, проведение скрининга на ТБ, а также его последующий мониторинг, являются неотъемлемой частью курации пациентов с ИВРЗ, которым планируется или уже проводится лечение с использованием любых ГИБП [36].

Ингибиторы Янус-киназ

Новым классом препаратов, используемым в терапии АС и ПсА, являются ингибиторы Янус-киназ. Имеющиеся данные свидетельствуют о сопоставимой эффективности тсБПВП — ингибиторов Янус-киназ (тофацитиниб — ТОФА, барицитиниб, упадацитиниб — УПАДА, филготииниб и др.) и ГИБП при лечении ПсА и АС [37], в связи с чем можно ожидать более широкое их применение в терапии этих заболеваний. Согласно имеющимся в литературе данным, частота СКИ на фоне терапии тсБПВП практически не отличается от таковой при лечении иФНО- α и составляет у больных ПсА 1,51 на 100 пациенто-лет (95% ДИ 0,00–14,74), у больных с аксСпА 1,28 на 100 пациенто-лет (95% ДИ 0,00–13,77) [9]. По данным метаанализа РКИ с периодом наблюдения 6–12 мес., острый назофарингит, инфекции ВДП, а также НЗ являлись наиболее частыми НЯ, возникающими на фоне терапии ТОФА и УПАДА у больных аксСпА и ПсА [38]. В РКИ EQUATOR с участием пациентов с ПсА, наиболее частыми НЯ на фоне терапии филготиинибом были назофарингит и головная боль, при этом единственный летальный исход в группе терапии произошёл вследствие пневмонии [39]. Реактивация латентной Herpes zoster-инфекции рассматривается рядом авторов как «класс-специфическая» неблагоприятная реакция при лечении тсБПВП [40, 41].

G. R. Burmester и соавт. [42], анализируя результаты применения ТОФА при ПсА, установили, что частота НЗ составила 2,0 (при суточной дозе препарата 10 мг), 2,7 (20 мг) и 2,1 (суммарно) на 100 пациенто-лет. Согласно долгосрочному анализу безопасности терапии УПАДА, у пациентов с ПсА ($n=2257$) большинство случаев НЗ в группах терапии 15 мг и 30 мг в сутки были нетяжёлыми (96 и 93% соответственно) и включали один (67 и 65% соответственно) или два (19 и 21% соответственно) дерматома. Поражение внутренних органов не было выявлено ни в одном случае. У одного пациента, получающего УПАДА в дозе 30 мг, имело место диссеминированное кожное поражение. У всех пациентов в группе УПАДА 15 мг и у 96% пациентов в группе УПАДА 30 мг развитие НЗ потребовало назначения терапии, при этом у 67% больных лечение УПАДА было временно приостановлено, а у 6 пациентов — полностью прекращено. Риск НЗ был выше у азиатских пациентов и увеличивался с возрастом. В то же время у вакцинированных пациентов случаев развития НЗ диагностировано не было [43]. По данным крупного метаанализа, выполненного E. Vaumrin и соавт. [44], приём ТОФА, ГК, а также комбинированная терапия ГИБП и сБПВП, являлись факторами риска развития НЗ у пациентов с ПсО и ПсА. В связи с этим авторы рекомендуют применение рекомбинантной вакцины против НЗ у всех больных ПсО/ПсА старше 50 лет, а также у пациентов моложе 50 лет, получающих терапию, повышающую риск возникновения этой инфекции.

Апремиласт (АПР)

АПР — таблетированный ингибитор фосфоэстеразы 4 типа, которая разрушает циклический аденозинмонофосфат. Увеличение содержания последнего в клетках, экспрессирующих ФДЭ4, сопровождается подавлением синтеза провоспалительных цитокинов, в том числе ФНО α , интерферона γ , ИЛ 12, 17, 22, 23 и хемокинов (CXCL9, CXCL10 и CCL4). Таким образом, АПР действует на начальном этапе воспалительного каскада и регулирует продукцию многочисленных компонентов воспалительного ответа [45].

По данным двух РКИ приём АПР в течение 6 мес. не ассоциировался с нарастанием частоты КИ у больных ПсА по сравнению с группой плацебо. При этом частота инфекций ВДП в группе больных ПсА, получавших АПР, составила от 3,4–4,6%, острого назофарингита — 8,3%. СКИ в группе терапии АПР зарегистрировано не было [46, 47]. G. M. Keating и соавт. [48] сообщили о низкой частоте СКИ (пневмония, инфекции МВП, дивертикулит) у больных с ПсА/ПсО на фоне терапии АПР, составившей 0,7 и 1,0 на 100 пациенто-лет при длительности терапии 52 нед. и

≥3 лет соответственно. K. W. Hagberg и соавт. [49] на когорте из 131 604 пациента с ПсА/ПсО показали, что частота возникновения или обострения НЗ, ВГС, ТБ при терапии АПР составила 7,0, 0,7 и 0,2 на 1000 пациенто-лет, соответственно.

ГК и сБПВП

Имеющиеся в литературе данные, касающиеся риска развития КИ на фоне терапии сБПВП и ГК у больных АС и ПсА, противоречивы и, как правило, рассматриваются в аспекте сопутствующего применения ГИБП. В частности, в исследовании, включавшем пациентов с РА, АС и ПсА ($n=341$), в группе терапии сБПВП частота КИ составила 14,2 на 100 пациенто-лет, при этом наибольшая частота КИ наблюдалась в группе комбинированного лечения иФНО- α и ГК — 62,7 на 100 пациенто-лет. Примечательно, что в данном исследовании не продемонстрировано статистически значимых отличий в частоте КИ среди больных РА и СпА, а также отмечено нарастание частоты КИ у больных СпА с увеличением значения BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, Батский индекс активности анкилозирующего спондилита) [50].

В нескольких метаанализах, основанных на результатах работ, опубликованных в библиографических базах данных PubMed, EMBASE и Cochrane, было продемонстрировано нарастание частоты СКИ у больных АС, получавших терапию иФНО- α , по сравнению с пациентами, принимавшими только нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)/плацебо или сБПВП, тем не менее статистически значимых отличий получено не было [51–53]. Напротив, по данным C. S. Moura и соавт. [54], частота СКИ была выше у пациентов с АС, получавших сБПВП (4,4 на 100 пациенто-лет), по сравнению с больными, принимавшими иФНО- α в качестве монотерапии или в комбинации с сБПВП (2,1 на 100 человеко-лет). В то же время приём ГК в дозе более 7,5 мг в сут в пересчёте на преднизолон ассоциировался с нарастанием риска СКИ в 4 раза.

Сходные данные были получены D. Wallis и соавт. [55] на основании анализа когорты из 440 больных. Период наблюдения составил $3,89 \pm 2,26$ года, 42 пациента получали ГК (средняя продолжительность приёма — 1,7 года, средняя доза — 14 мг в сутки в пересчёте на преднизолон), 124 — сБПВП (МТ — 15%), 264 — иФНО- α . Было зарегистрировано 259 случаев КИ, из них 23 — СКИ. Наиболее распространёнными КИ были инфекции НДП, в качестве ведущего этиологического фактора выступали бактерии (80%). Продemonстрирована взаимосвязь между приёмом сБПВП (ОШ 1,69, 95% ДИ 1,19–2,39; $p=0,003$), ГК (ОШ 1,9, 95% ДИ 1,08–3,34; $p=0,003$) и риском раз-

вития КИ, в то время как взаимосвязи ассоциации с приёмом иФНО- α выявлено не было. D. H. Lim и соавт. [56] оценили риск развития НЗ у больных АС, получавших иФНО- α , сБПВП и только монотерапию НПВП. Частота НЗ составила 11 на 1000 пациенто-лет. Наиболее часто НЗ регистрировался у пациентов, получавших иФНО- α и сБПВП. Факторами риска являлись женский пол и пожилой возраст. В другом исследовании комбинированный приём ГИБП и МТ также повышал риск развития НЗ у больных ПсО и ПсА (ОР 1,66, 95% ДИ 1,08–2,57; $p=0,02$) [57].

VCD-180, моноклональное антитело к TRBV9+ Т-лимфоцитам

Препарат VCD-180 (международное непатентованное наименование — сенипрутут) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело к сегменту TRBV9, которое посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности приводит к элиминации TRBV9+ Т-лимфоцитов, включая аутореактивные клоны [58]. Согласно опубликованным результатам Международного многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования фазы 2 ELEFTA (NCT05445076) у пациентов с рентгенологическим аксСпА или АС, получавших сенипрутут в период до 24-й недели, НЯ, относящиеся к группе инфекционных заболеваний, отмечались редко — у 11/210 пациентов (4,2%) — и соответствовали лёгкой и средней степени тяжести по действующей версии Общих терминологических критериев нежелательных явлений (Common Terminology Criteria for Adverse Events — CTCAE 5.0). Самым частым проявлением была вирусная инфекция дыхательных путей, зарегистрированная у 3 пациентов в группе VCD-180 7 мг/кг (1,2%); остальные события регистрировались в единичных случаях. В период с 24-й недели до 36-й недели инфекционные заболевания были зафиксированы у 3/210 (1,2%) пациентов, соответствовали средней степени тяжести и были представлены единичными случаями инфицированной кожной кисты, пневмонии и острого среднего отита [59].

COVID-19

Особого внимания заслуживает новая коронавирусная инфекция (Coronavirus disease-19, COVID-19). По состоянию на 1 сентября 2024 г. в мире насчитывалось более 776 млн подтверждённых случаев заболевания, в том числе более чем 7 млн летальных исходов [60]. Учитывая повышенную склонность пациентов с ИВРЗ к развитию инфекционных заболеваний, изучение тече-

ния и исходов COVID-19 у больных ИВРЗ, явилось актуальной проблемой для всего мирового медицинского сообщества [61]. Согласно данным Глобального ревматологического альянса (Global Rheumatology Alliance), частота случаев COVID-19, потребовавших госпитализации больных ПсА, составила 8%, другими СпА — 6%. Факторами риска госпитализации при COVID-19 среди пациентов с ИВРЗ были возраст >65 лет, наличие коморбидных заболеваний, включая гипертонию, хронические заболевания лёгких, сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, хроническую болезнь почек, приём ГК ($p<0,01$ во всех случаях). Неблагоприятного влияния терапии сБПВП, тБПВП и ГИБП выявлено не было [62].

Анализ данных многоцентровой исследовательской интернет-сети TriNetX, которая аккумулирует электронную информацию из нескольких центров по всей территории США, показал, что по сравнению с лицами без ИВРЗ больные аксСпА имели более низкий риск смертности от COVID-19 (ОР 0,71, 95% ДИ 0,60–0,84; $p<0,0001$), а также более низкую частоту тяжёлых форм COVID-19 (ОР 0,79, 95% ДИ 0,69–0,91; $p=0,0007$), госпитализаций (ОР 0,87, 95% ДИ 0,83–0,92; $p<0,0001$) и острой почечной недостаточности (ОР 0,90, 95% ДИ 0,82–0,997; $p=0,044$) и, напротив, более высокий риск венозных тромбозов (ОР 1,22, 95% ДИ 1,04–1,43; $p=0,016$). При анализе влияния использования иФНО- α как минимум в течение одного года до развития COVID-19 оказалось, что эта группа препаратов практически не влияла на исходы COVID-19 [63]. Сходные данные об отсутствии влияния иФНО- α на тяжесть COVID-19 получены отечественными учёными [64].

Вакцинация пациентов

В неразрывной связи с вопросами частоты и структуры КИ стоят методы их профилактики, в том числе с помощью вакцин. Актуальность рассматриваемой проблемы отражают недавно обновлённые рекомендации Европейского альянса ассоциаций ревматологов (EULAR) и Американской коллегии ревматологов (ACR) по вакцинации пациентов с ИВРЗ [65, 66], в которых подчёркивается высокий риск летальных исходов от наиболее распространённых среди больных ИВРЗ инфекций ДП, особенно у пациентов старшей возрастной группы (>65 лет), а также получающих иммуносупрессивную терапию, в связи с чем настоятельно рекомендуется иммунизация против гриппа и пневмококковой инфекции пациентов данных категорий. При этом вакцинация инактивированными гриппозными вакцинами, а также пневмококковыми вакцинами возможна на фоне продолжающейся противоревматической терапии (ГК, сБПВП, иФНО- α , иИЛ-17,

и ИЛ-12/23). С целью усиления иммунного ответа, при стабильном течении ИВРЗ возможна временная (на 2 нед.) отмена МТ [65, 66]. Наше собственное исследование, проведённое у больных АС и ПСА, продемонстрировало удовлетворительную безопасность, иммуногенность и клиническую эффективность инактивированной трёхвалентной гриппозной сплит-вакцины и 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакцины у данных пациентов [67, 68].

Заключение

Таким образом, имеющиеся в литературе данные позволяют сделать вывод о более высокой частоте КИ у больных СпА, получающих различную антиревматическую терапию в сравнении с популяцией в целом. Несмотря на широкий спектр КИ у больных СпА, лидирующее место в структуре как КИ, так и СКИ занимают инфекции ДП, с меньшей частотой встречаются инфекции кожи и ЖКТ, при этом в качестве ведущего этиологического фактора выступают бактерии. С другой стороны, данные, касающиеся частоты и факторов риска развития инфекций у больных СпА сильно разнятся в зависимости от анализируемой популяции и проводимой терапии, что подчёркивает необхо-

димость проведения собственных исследований, направленных на изучение частоты и структуры КИ, а также оценку факторов риска КИ среди российской популяции больных СпА. Кроме того, особенности механизма действия определённых лекарственных препаратов, используемых в терапии СпА, позволяют рассматривать ряд КИ как «класс-специфические» осложнения терапии, что диктует необходимость выделения групп риска среди этих больных с целью оптимизации методов профилактики.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», № государственного задания 1021051503137-7.

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

Литература/References

1. Эрдеc Ш. Ф., Ребров А. П., Дубинина Т. В. и др. Спондилоартриты: современная терминология и определения. *Терапевтический архив*. 2019; 91 (5): 84–88. doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2019.05.000208>. [Erdes Sh. F., Rebrov A. P., Dubinina T. V., et al. Spondyloarthritis: modern terminology and definitions. *Therapeutic Archive*. 2019; 91 (5): 84–88.] doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2019.05.000208>. (in Russian)]
2. Haroon N., Inman R. D., Leach T. J. et al. The impact of tumor necrosis factor alpha inhibitors on radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2013; 65: 2645–2654. doi: 10.1002/art.38070.
3. Barkham N., Keen H. I., Coates L. C. et al. Clinical and imaging efficacy of infliximab in HLA-B27-positive patients with magnetic resonance imaging-determined early sacroiliitis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 946–954. doi: 10.1002/art.24408.
4. Baillet A., Gossec L., Carmona L. et al. Points to consider for reporting, screening for and preventing selected comorbidities in chronic inflammatory rheumatic diseases in daily practice: a EULAR initiative. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75 (6): 965–973. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209233.
5. Белов Б. С., Тарасова Г. М., Буханова Д. В. Коморбидные инфекции при ревматических заболеваниях. *Антибиотики и химиотер*. 2019; 64 (1–2): 50–57. [Belov B. S., Tarasova G. M., Bukhanova D. V. Comorbid infections in rheumatic diseases. *Antibiot Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2019; 64 (1–2): 50–57. doi: <https://doi.org/10.24411/0235W2990W2019W10009>. (in Russian)]
6. Лапина С. А., Дубинина Т. В., Бадюкин В. В. и др. Ингибиторы фактора некроза опухоли α в лечении аксиальных спондилоартритов (включая анкилозирующий спондилит). *Научно-практическая ревматология*. 2016; 54 (Приложение 1): 75–79. [Lapshina S. A., Dubinina T. V., Badokin V. V. et al. Tumor necrosis factor-α inhibitors in the treatment of axial spondyloarthritis, including ankylosing spondylitis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2016; 54 (Suppl. 1): 75–79.] doi: <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2016-1S-75-79>.
7. Aurreal M., Seauve M., Laplane S. et al. Incidence of infections in patients with psoriatic arthritis and axial spondyloarthritis treated with biological or targeted disease-modifying agents: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials, open-label studies and observational studies. *RMD Open*. 2023; 9: e003064. doi: 10.1136/rmdopen-2023-003064.
8. Atzeni E., Sarzi-Puttini P., Sebastiani M. et al. Rate of serious infections in spondyloarthropathy patients treated with anti-tumour necrosis factor drugs: a survey from the Italian registry GISEA. *Clin Exp Rheumatol*. 2019; 37 (4): 649–655.
9. Burmester G. R., Gordon K. B., Rosenbaum J. T. et al. Long-term safety of adalimumab in 29,967 adult patients from global clinical trials across multiple indications: an updated analysis. *Adv Ther*. 2020; 37 (1): 364–380. doi: 10.1007/s12325-019-01145-8.
10. Aurreal M., Seauve M., Laplane S. et al. Incidence of infections in patients with psoriatic arthritis and axial spondyloarthritis treated with biological or targeted disease-modifying agents: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials, open-label studies and observational studies. *RMD Open*. 2023; 9 (3): e003064. doi: 10.1136/rmdopen-2023-003064.
11. Deodhar A., Mease P. J., McInnes I. B. et al. Long-term safety of secukinumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: integrated pooled clinical trial and post-marketing surveillance data. *Arthritis Res Ther*. 2019; 21 (1): 111. doi: 10.1186/s13075-019-1882-2.
12. Combe B., Rahman P., Kameda H. et al. Safety results of ixekizumab with 1822.2 patient-years of exposure: an integrated analysis of 3 clinical trials in adult patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2020; 22 (1): 14. doi: 10.1186/s13075-020-2099-0.
13. Ghosh S., Gensler L. S., Yang Z. et al. Ustekinumab safety in psoriasis, psoriatic arthritis, and crohn's disease: an integrated analysis of phase II/III clinical development programs. *Drug Saf*. 2019; 42 (6): 751–768. doi: 10.1007/s40264-019-00797-3.
14. Ritchlin C. T., Stahle M., Poulin Y., Bagel J., Chakravarty S. D., Kafka S., Srivastava B., Langholff W., Gottlieb A. B. Serious infections in patients with self-reported psoriatic arthritis from the Psoriasis Longitudinal Assessment and Registry (PSOLAR) treated with biologics. *BMC Rheumatol*. 2019; 3: 52. doi: 10.1186/s41927-019-0094-3.
15. Li X., Andersen K. M., Chang H. Y., Curtis J. R., Alexander G. C. Comparative risk of serious infections among real-world users of biologics for psoriasis or psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2020; 79 (2): 285–291. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216102.

16. *Quartuccio L., Zabotti A., Del Zotto S. et al.* Risk of serious infection among patients receiving biologics for chronic inflammatory diseases: Usefulness of administrative data. *J Adv Res.* 2018; 15: 87–93. doi: 10.1016/j.jare.2018.09.003.
17. *Баранова М. М., Муравьева Н. В., Белов Б. С., Коротаева Т. В., Глухова С. И.* Коморбидные инфекции у больных спондилоартритами: частота, структура, факторы риска. *Современная ревматология.* 2023; 17 (4): 64–70. [Baranova M. M., Muravyeva N. V., Belov B. S., Korotaeva T. V., Glukhova S. I. Comorbid infections in patients with spondyloarthritis: frequency, structure and risk factors. *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal.* 2023; 17 (4): 64–70. doi: <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2023-4-64-70>. (in Russian)]
18. *Lee S. K., Kim S. Y., Kim E. Y. et al.* Mycobacterial infections in patients treated with tumor necrosis factor antagonists in South Korea. *Lung.* 2013; 191 (5): 565–71. doi: 10.1007/s00408-013-9481-5.
19. *Murdaca G., Negrini S., Pellecchio M. et al.* Update upon the infection risk in patients receiving TNF alpha inhibitors. *Expert Opin Drug Saf.* 2019; 18 (3): 219–229. doi: 10.1080/14740338.2019.1577817.
20. *Aydin V., Akici A., Isli F. et al.* Relative risk of tuberculosis in patients with rheumatic diseases managed with anti-tumour necrosis factor-alpha therapy: A nationwide cohort study. *J Clin Pharm Ther.* 2019; 44 (4): 553–560. doi: 10.1111/jcpt.12814.
21. *Lin T. C., Yoshida K., Tedeschi S. K. et al.* Risk of hepatitis b virus reactivation in patients with inflammatory arthritis receiving disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2018; 70 (5): 724–731. doi: 10.1002/acr.23346.
22. *Blumen Wroński J., Fiedor P.* The safety profile of tumor necrosis factor inhibitors in ankylosing spondylitis: are TNF inhibitors safer than we thought? *J Clin Pharmacol.* 2019; 59 (4): 445–462. doi: 10.1002/jcph.1348.
23. *Fragoulis G. E., Dey M., Zhao S. et al.* Systematic literature review informing the 2022 EULAR recommendations for screening and prophylaxis of chronic and opportunistic infections in adults with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *RMD Open.* 2022; 8 (2): e002726. doi: 10.1136/rmdopen-2022-002726.
24. *Hagberg K. W., Persson R., Vasilakis-Scaramozza C. et al.* Herpes Zoster, Hepatitis C, and tuberculosis risk with apremilast compared to biologics, DMARDs and corticosteroids to treat psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Epidemiol.* 2020; 12: 153–161. doi: 10.2147/CLEP.S239511.
25. *Deodhar A., van der Heijde D., Gensler L. S. et al.* COAST-X Study Group. Ixekizumab for patients with non-radiographic axial spondyloarthritis (COAST-X): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2020; 395 (10217): 53–64. doi: 10.1016/S0140-6736 (19)32971-X.
26. *Wang P., Zhang S., Hu B. et al.* Efficacy and safety of interleukin-17A inhibitors in patients with ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Rheumatol.* 2021; 40 (8): 3053–3065. doi: 10.1007/s10067-020-05545-y.
27. *Yin Y., Wang M., Liu M. et al.* Efficacy and safety of IL-17 inhibitors for the treatment of ankylosing spondylitis: a systematic re-view and meta-analysis. *Arthritis Res Ther.* 2020; 22 (1): 111. doi: 10.1186/s13075-020-02208-w.
28. *Коротаева Т. В., Мазуров В. И., Лила А. М. и др.* Эффективность и безопасность нетакимаба у пациентов с псориатическим артритом: результаты клинического исследования III фазы PATERA. *Научно-практическая ревматология.* 2020; 58 (5): 480–488. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2020-480-488>. [Korotaeva T. V., Mazurov V. I., Lila A. M. et al. Efficacy and safety of ne-takimab in patients with psoriatic arthritis: results of the phase III PATERA clinical study. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice* 2020; 58 (5): 480–488. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2020-480-488>. (in Russian)]
29. *Коротаева Т. В., Мазуров В. И., Лила А. М. и др.* Нетакимаб для лечения псориатического артрита: результаты 3 лет исследования фазы III BCD-085-8/PATERA. *Современная ревматология.* 2024; 18 (4): 33–42. doi: <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2024-4-33-42>. [Korotaeva T. V., Mazurov V. I., Lila A. M., et al. Netakimab for the treatment of psoriatic arthritis: 3-year results of the phase III BCD-085-8/PATERA study. *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal.* 2024; 18 (4): 33–42.]. doi: <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2024-4-33-42>. (in Russian)]
30. *McInnes I.B., Mease P.J., Kirkham B. et al.* FUTURE 2 Study Group. Secukinumab, a human anti-interleukin-17A monoclonal antibody, in patients with psoriatic arthritis (FUTURE 2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2015; 386 (9999): 1137–46. doi: 10.1016/S0140-6736 (15)61134-5.
31. *Saunte D. M., Mrowietz U., Puig L., Zachariae C.* Candida infections in patients with psoriasis and psoriatic arthritis treated with interleukin-17 inhibitors and their practical management. *Br J Dermatol.* 2017; 177 (1): 47–62. doi: 10.1111/bjd.15015.
32. *Winthrop K. L., Mariette X., Silva J. T. et al.* ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts (ESGICH) Consensus Document on the safety of targeted and biological therapies: an infectious diseases perspective (Soluble immune effector molecules [II]: agents targeting interleukins, immunoglobulins and complement factors). *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24 Suppl 2: S21–S40. doi: 10.1016/j.cmi.2018.02.002.
33. *McKeage K.* Ustekinumab: a review of its use in psoriatic arthritis. *Drugs.* 2014; 74 (9): 1029–39. doi: 10.1007/s40265-014-0242-4.
34. *Mease P.J., Rahman P., Gottlieb A. B. et al.* DISCOVER-2 Study Group. Guselkumab in biologic-naïve patients with active psoriatic arthritis (DISCOVER-2): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2020; 395 (10230): 1126–1136. doi: 10.1016/S0140-6736 (20)30263-4.
35. *McInnes I.B., Rahman P., Gottlieb A. B. et al.* Efficacy and safety of Guselkumab, a monoclonal antibody specific to the p19 Subunit of Interleukin-23, through two years: results from a phase iii, randomized, double-blind, placebo-controlled study conducted in biologic-naïve patients with active psoriatic arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2022; 74 (3): 475–485. doi: 10.1002/art.2010.
36. *Лукина Г. В., Борисов С. Е.* Скрининг и мониторинг туберкулёзной инфекции у больных ревматическими заболеваниями, получающими генно-инженерные биологические препараты. *Насонов Е. Л. (редактор). Российские клинические рекомендации. Ревматология. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2017; 394–410. [Lukina G. V., Borisov S. E. Screening and monitoring of tuberculosis infection in patients with rheumatic diseases receiving genetically engineered biological drugs. In: Nasonov E. L. (ed.). Rossiiskie Klinicheskie Rekomendatsii. Revmatologiya. Russian Clinical Guidelines. Rheumatology]. Moscow: GEOTAR-Media; 2017; 394–410]. (in Russian)]*
37. *Насонов Е. Л., Коротаева Т. В.* Ингибиторы Янус-киназы при иммуновоспалительных заболеваниях: 10 лет клинической практики в ревматологии. *Научно-практическая ревматология.* 2022; 60 (2): 131–148. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2022-131-148>. [Nasonov E. L., Korotaeva T. V. Janus kinase inhibitors in immunoinflammatory diseases: 10 years of clinical practice in rheumatology. *Rheumatology Science and Practice.* 2022; 60 (2): 131–148. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2022-131-148>. (in Russian)]
38. *Keeling S., Maksymowych W. P.* JAK inhibitors, psoriatic arthritis, and axial spondyloarthritis: a critical review of clinical trials. *Expert Rev Clin Immunol.* 2021; 17 (7): 701–715. doi: 10.1080/1744666X.2021.1925541.
39. *Mease P., Coates L. C., Helliwell P. S. et al.* Efficacy and safety of filgotinib, a selective Janus kinase 1 inhibitor, in patients with psoriatic arthritis (EQUATOR): results from a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2018 Dec 1; 392 (10162): 2367–2377. doi: 10.1016/S0140-6736 (18)32483-8. Epub 2018 Oct 22. PMID: 30360969.
40. *Almanzar G., Kienle F., Schmalzing M. et al.* Tofacitinib modulates the VZV-specific CD4+ T cell immune response in vitro in lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2019; 58 (11): 2051–2060. doi: 10.1093/rheumatology/kez175.
41. *Atzeni F., Talotta R., Nucera V. et al.* Adverse events, clinical considerations and management recommendations in rheumatoid arthritis patients treated with JAK inhibitors. *Expert Rev Clin Immunol.* 2018; 14 (11): 945–956. doi: 10.1080/1744666X.2018.1504678.
42. *Burmester G. R., Curtis J. R., Yun H. et al.* An integrated analysis of the safety of Tofacitinib in psoriatic arthritis across phase III and long-term extension studies with comparison to real-world observational data. *Drug Saf.* 2020; 43 (4): 379–392. doi: 10.1007/s40264-020-00904-9.
43. *Burmester G. R., Winthrop K., Blanco R. et al.* Safety profile of Upadacitinib up to 3 years in psoriatic arthritis: an integrated analysis of two pivotal phase 3 trials. *Rheumatol Ther.* 2022; 9 (2): 521–539. doi: 10.1007/s40744-021-00410-z.
44. *Baumrin E., Van Voorhees A., Garg A. et al.* A systematic review of herpes zoster incidence and consensus recommendations on vaccination in adult patients on systemic therapy for psoriasis or psoriatic arthritis: From the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. *J Am Acad Dermatol.* 2019; 81 (1): 102–110. doi: 10.1016/j.jaad.2019.03.017.
45. *Haber S. L., Hamilton S., Bank M. et al.* Apremilast: a novel drug for treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Pharmacother.* 2016; 50 (4): 282–90. doi: 10.1177/1060028015627467.
46. *Nash P., Ohson K., Walsh J. et al.* Early and sustained efficacy with apremilast monotherapy in biological-naïve patients with psoriatic arthritis: a phase IIIB, randomised controlled trial (ACTIVE). *Ann Rheum Dis.* 2018; 77 (5): 690–698. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211568.
47. *Wells A. F., Edwards C. J., Kivitz A. J. et al.* Apremilast monotherapy in DMARD-naïve psoriatic arthritis patients: results of the randomized, placebo-controlled PALACE 4 trial. *Rheumatology (Oxford).* 2018; 57 (7): 1253–1263. doi: 10.1093/rheumatology/key032.
48. *Keating G. M.* Apremilast: a review in psoriasis and psoriatic arthritis. *Drugs.* 2017; 77 (4): 459–472. doi: 10.1007/s40265-017-0709-1.
49. *Hagberg K. W., Persson R., Vasilakis-Scaramozza C. et al.* Herpes Zoster, Hepatitis C, and tuberculosis risk with apremilast compared to biologics,

- DMARDs and corticosteroids to treat psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Epidemiol.* 2020; 12: 153–161. doi: 10.2147/CLEPS239511.
50. *Germano V, Cattaruzza M. S., Osborn J. et al.* Infection risk in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients under treatment with DMARDs, corticosteroids and TNF- α antagonists. *J Transl Med.* 2014; 12: 77. doi: 10.1186/1479-5876-12-77.
 51. *Fouque-Aubert A., Jette-Paulin L., Combescurie C. et al.* Serious infections in patients with ankylosing spondylitis with and without TNF blockers: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69 (10): 1756–61. doi: 10.1136/ard.2008.098822.
 52. *Wang S., He Q., Shuai Z.* Risk of serious infections in biological treatment of patients with ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2018; 37 (2): 439–450. doi: 10.1007/s10067-017-3966-1.
 53. *Xu Z., Xu P., Fan W. et al.* Risk of infection in patients with spondyloarthritis and ankylosing spondylitis receiving antitumor necrosis factor therapy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Exp Ther Med.* 2017; 14 (4): 3491–3500. doi: 10.3892/etm.2017.5003.
 54. *Moura C. S., Rahme E., Maksymowych W. P. et al.* Use of disease-modifying anti-rheumatic or anti-tumour necrosis factor drugs and risk of hospitalized infection in ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol.* 2019; 48 (2): 121–127. doi: 10.1080/03009742.2018.1470253.
 55. *Wallis D., Thavaneswaran A., Haroon N. et al.* Tumour necrosis factor in-hibitor therapy and infection risk in axial spondyloarthritis: results from a longitudinal observational cohort. *Rheumatology (Oxford).* 2015; 54 (1): 152–6. doi: 10.1093/rheumatology/keu255.
 56. *Lim D. H., Kim Y. J., Kim S. O. et al.* The risk of herpes zoster in patients with ankylosing spondylitis: Analysis of the Korean National Health Insurance Service — Sample cohort database. *Mod Rheumatol.* 2018; 28 (1): 168–173. doi: 10.1080/14397595.2017.1325034.
 57. *Takeshita J., Grewal S., Langan S. M. et al.* Psoriasis and comorbid diseases: Implications for management. *J Am Acad Dermatol.* 2017; 76 (3): 393–403. doi: 10.1016/j.jaad.2016.07.065.
 58. *Britanova O. V., Lupyr K. R., Staroverov D. B. et al.* Targeted depletion of TRBV9+ T cells as immunotherapy in a patient with ankylosing spondylitis. *Nat Med.* 2023; 29 (11): 2731–2736. doi: 10.1038/s41591-023-02613-z.
 59. *Насонов Е. Л., Мазуров В. И., Лила А. М. и др.* Эффективность и безопасность препарата BCD-180, моноклонального антитела к TRBV9+ Т-лимфоцитам, у пациентов с активным рентгенологическим аксиальным спондилоартритом: результаты 36 недель рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования фазы 2 ELEFTA. *Научно-практическая ревматология.* 2024; 62 (1): 65–80. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2024-65-80>. [Nasonov E. L., Mazurov V. I., Lila A. M. et al. Effectiveness and safety of BCD180, anti-TRBV9+ T-lymphocytes monoclonal antibody in patients with active radiographic axial spondyloarthritis: 36-week results of double-blind randomized placebo-controlled phase II clinical study ELEFTA. *Rheumatology Science and Practice.* 2024; 62 (1): 65–80. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2024-65-80>. (in Russian)]
 60. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard/<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
 61. *Белов Б. С., Каратеев А. Е.* COVID-19: новый вызов ревматологам. *Современная ревматология.* 2020; 14 (2): 110–116. doi: <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2020-2-110-116>. [Belov B. S., Karateev A. E. COVID-19: the new challenge for rheumatologists. *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal.* 2020; 14 (2): 110–116. doi: <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2020-2-110-116>. (in Russian)]
 62. *Gianfrancesco M., Hyrich K. L., Al-Adely S. et al.* COVID-19 Global Rheumatology Alliance. Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. *Ann Rheum Dis.* 2020; 79 (7): 859–866. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-217871.
 63. *Raiker R., Pakhchanian H., Kavadiachanda C. et al.* Axial spondyloarthritis may protect against poor outcomes in COVID-19: propensity score matched analysis of 9766 patients from a nationwide multi-centric research network. *Clin Rheumatol.* 2022; 41 (3): 721–730. doi: 10.1007/s10067-021-05979-y.
 64. *Куликов А. Н., Муравьева Н. В., Белов Б. С.* Факторы риска тяжелого течения COVID-19 у больных ревматическими заболеваниями. *Научно-практическая ревматология.* 2024; 62 (1): 24–31. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2024-24-31>. [Kulikov A. N., Muravyeva N. V., Belov B. S. Risk factors for severe COVID-19 in patients with rheumatic diseases. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologia = Rheumatology Science and Practice.* 2024; 62 (1): 24–31. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2024-24-31>. (in Russian)]
 65. *Furer V., Rondaan C., Heijstek M. W. et al.* 2019 update of EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2020; 79 (1): 39–52. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215882.
 66. *Bass A. R., Chakravarty E., Akl E. A. et al.* 2022 American College of Rheumatology Guideline for Vaccinations in patients with rheumatic and musculoskeletal diseases. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2023; 75 (3): 449–464. doi: 10.1002/acr.25045.
 67. *Баранова М. М., Муравьева Н. В., Белов Б. С., Диатроптов М. Е.* Иммуногенность, эффективность и безопасность трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины у больных анкилозирующим спондилитом и псориатическим артритом. *Научно-практическая ревматология.* 2024; 62 (3): 293–299. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2024-293-299>. [Baranova M. M., Muravyeva N. V., Belov B. S., Diatroptov M. E. Immunogenicity, efficacy and safety of the three-valent in-activated influenza split vaccine in patients with ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologia = Rheumatology Science and Practice.* 2024; 62 (3): 293–299. doi: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2024-293-299>. (in Russian)]
 68. *Баранова М. М., Муравьева Н. В., Белов Б. С., Верижникова Ж. Г.* Опыт применения 23-валентной пневмококковой полисахаридной вакцины у больных анкилозирующим спондилитом и псориатическим артритом. *Медицинский алфавит.* 2023; (31): 15–20. doi: <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-31-15-20>. [Baranova M. M., Muravyeva N. V., Belov B. S., Verizhnikova Zh. G. Experience with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in patients with ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Medical alphabet.* 2023; (31): 15–20. doi: <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-31-15-20>. (in Russian)]

Поступила / Received 20.11.2024

Принята в печать / Accepted 30.11.2024

Информация об авторах

Баранова Марина Михайловна — младший научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5264-337X. ResearcherID: JDD-0658-2023, Scopus Author ID: 57222430929

Муравьева Наталья Валерьевна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-4327-6720. ResearcherID: AAF-4853-2021. eLIBRARY SPIN-код: 8418-4469. Scopus Author ID: 57210263706

Белов Борис Сергеевич — д. м. н., заведующий лабораторией коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7091-2054. ResearcherID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN-код: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

About the authors

Marina M. Baranova — Junior Researcher at the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5264-337X. ResearcherID: JDD-0658-2023, Scopus Author ID: 57222430929

Natalia V. Muravyeva — Ph. D. in Medicine, Senior Researcher at the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-4327-6720. ResearcherID: AAF-4853-2021. eLIBRARY SPIN-code: 8418-4469. Scopus Author ID: 57210263706

Boris S. Belov — D. Sc. in Medicine Head of the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7091-2054. ResearcherID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN-code: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

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

1. Статьи направляются по адресу: journalgncs@yandex.ru или размещаются ЧЕРЕЗ САЙТ журнала после регистрации в личном кабинете автора. Рукописи статей в 1 экз. направляются по адресу: **Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия», ул. Нагатинская, д. 3а, 117105.** Рукопись должна иметь сопроводительное письмо, подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа. Статья подписывается всеми авторами **с указанием ответственного за переписку (Ф.И.О., адрес, телефон).**

2. В выходных данных статьи указываются: название статьи, инициалы, фамилии авторов, наименования учреждений всех авторов.

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

4. Объём оригинальной статьи (как правило) не должен превышать 12 страниц, включая таблицы и иллюстрации, общее количество иллюстраций — не более 5. Объём обзорной статьи не должен превышать 20 страниц, а список цитируемой литературы — не более 100 названий. Объём заказанных статей устанавливается по договоренности.

5. Оригинальная статья должна включать (по порядку) следующие основные разделы: «**Резюме**» — не более 1 страницы; «**Введение**» с кратким обзором литературы и постановкой цели исследования; «**Материал и методы**» — с детальным описанием объектов исследований, методических приёмов и квалификаций использованных реагентов (фирм-изготовителей); «**Результаты исследований**» и «**Обсуждение результатов**» или «**Результаты и обсуждение**», «**Заключение**» или «**Выводы**» (по пунктам); «**Литература**» — с указанием цитируемых источников. В конце статьи приводятся «**Сведения об авторах**»: фамилия, имя и отчество полностью, учёная степень, звание, должность, место работы. Для автора, ответственного за переписку, указываются: почтовый адрес для корреспонденции, e-mail и телефон.

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

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. В рукописи на обороте каждого рисунка указывается фамилия первого автора статьи, номер рисунка, обозначается верх рисунка. В тексте статьи обязательны ссылки на рисунок. Рисунки и таблицы не должны дублировать друг друга. Для графиков и диаграмм отмечается, **что дано по осям координат** на приведённых кривых и т. п.

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

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

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

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

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

13. **Цитируемые источники литературы** во всех видах публикаций нумеруются в порядке их упоминания в тексте статьи арабскими цифрами и заключаются в квадратные скобки. В пристатейном списке литературы каждый источник следует помещать с новой строки под порядковым номером. Количество цитируемых работ в оригинальных статьях и лекциях допускается до 40 источников, в обзорах — до 100 источников. В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Указываются фамилия, инициалы автора, название статьи, журнала, год, том, номер журнала, номера страниц «от» и «до»; в случае монографии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, издательство, год, количество страниц.

Недопустимо сокращать названия статей и названия отечественных журналов. Названия англоязычных журналов следует приводить в сокращении в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine, если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название.

Оформление списка литературы должно удовлетворять требованиям РИНЦ и международных баз данных. В связи с этим, в ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице. То есть, библиографические описания ссылок на русскоязычные источники должны состоять из двух частей: русскоязычной и латиноязычной (подряд). При этом сначала следует приводить русскоязычную часть описания, затем — латиноязычную. Желательно вставлять doi статьи.

Таким образом, если статья написана на латинице, то она должна быть процитирована в оригинальном виде:

Lang P.O., Michel J.P., Zekry D. Frailty syndrome: A transitional state in a dynamic process. Gerontology. 2009; 55 (5): 539–549.

Если статья написана на кириллице и у статьи есть официальный перевод названия, его нужно вставить в квадратных скобках после оригинального написания библиографической ссылки на источник. Если нет официального перевода, то нужно привести транслитерацию всей ссылки сразу после ссылки в оригинальном исполнении. В конце ссылки в квадратных скобках вставляется in Russian, без точки в конце:

Ткачева О.Н., Рунихина Н.К., Остапенко В.С. Валидация опросника для скрининга синдрома старческой астении в амбулаторной практике. Успехи геронтологии. 2017; 30 (2): 236–242. [Tkacheva O.N., Runikhina N.K., Ostapenko V.S. Validacija oprosnika dlja skrininga sindroma starcheskoj astenii v ambulatornoj praktike. Uspekhi Gerontologii 2017; 30 (2): 236–242. (in Russian)]

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

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

16. Статьи, принятые в журнал, проходят рецензирование. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

17. Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.

Реамберин®

НАВСТРЕЧУ ЖИЗНИ



➔ Сбалансированный
сукцинатсодержащий
кристаллоидный
раствор

➔ Сокращает сроки
госпитализации и
летальность²

➔ Оказывает
дезинтоксикационное,
антиоксидантное
и антигипоксическое
действия¹

➔ Нормализует
кисотно-основное
состояние^{1,3}



Инфузионная терапия

Форма выпуска: раствор для инфузий 1,5 %, в бутылках стеклянных 200 и 400 мл, в контейнерах из многослойной полиолефиновой пленки по 250 или 500 мл. Рег. номер №ЛП(000801)-(РГ-RU) от 19.05.22. Реклама.

1. Общая характеристика лекарственного препарата РЕАМБЕРИН® раствор для инфузий 1,5% МЗ РФ
2. Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., соавт., «Препараты янтарной и фумаровой кислот как средства профилактики и терапии различных заболеваний», «Журнал фундаментальной медицины и биологии», 2016, №3
3. Герасимов Л.В., Марченков Ю.В., соавт. «Возможности коррекции метаболических нарушений с использованием реамберина в остром периоде травмы», Анестезиология и реаниматология № 6, 2015

 **Полисан**