

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 67



7–8'2022

Научно-практический журнал

Учредители:

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. 3а, 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»



Издательство
ОКИ

Подписка через объединённый
каталог «Пресса России»
или через «Агентство «КнигаСервис»:
подписной индекс — Е71404

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

Установочный тираж 5000 экз.

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: август 2022

Свободная цена

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 67

7–8'2022

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. А.
Академик РАН, профессор, д. б. н. Говорун В. М.
Чл. корр. РАН, профессор, д. б. н. Ильина Е. Н.
Профессор, д. м. н. Климко Н. 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

Беседнова Н. Н.	Зуева Л. П.
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.

Founders:

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:
Ludmila B. Smirnova, Ph. D. in Biology
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:
ООО «Литера»

Release Date: august 2022

Free price

ISSN 0235-2990

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

ANTIBIOTIKI I KHIOTERAPIYA

Volume 67

7–8'2022

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 A. 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 Nikolay N. Klimko
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

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Natalia N. Besednova	Lyudmila P. Zueva
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

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 статьи

- Дин Фань, Стоянова Л. Г., Нетрусов А. И.
Микробиомы кефирных зёрен из регионов исторического происхождения и их пробиотический потенциал
Гуров А. В., Боровкова К. Е., Крышень К. Л.,
Никифорова Л. Р., Салмова Ю. В.
Оценка бактерицидной активности грамицидина С в отношении клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* при однократном и многократном воздействии
Любимов И. И., Исаева Е. И., Ветрова Е. Н.,
Лаврова А. В., Грецакая Н. М., Серков И. В.,
Безуглов В. В., Галегов Г. А.
Исследование антивирусной активности адамантансодержащих химических соединений
Журавлёва М. В., Рощина Е. А., Лосева Е. А., Гуров А. В.
Оценка токсикологического профиля новой лекарственной формы препарата Диоксидин (раствор для местного и наружного применения, 0,025%)

Клинические исследования и практика

- Куликов А. Н., Муравьева Н. В., Белов Б. С.
Безопасность комбинированной векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) у пациентов с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями: предварительные данные
Коломиец В. М., Польшикова Н. А.,
Коваленко А. Л., Павленко Е. П.
Состояние проблемы коморбидных социально-значимых инфекций в условиях пандемии COVID-19
Темирбулатов И. И., Крюков А. В.,
Мирзаев К. Б., Денисенко Н. П., Абдуллаев Ш. П.,
Жилякова А. С., Шевчук Ю. В., Вечорко В. И.,
Аверков О. В., Сычев Д. А.
Влияние носительства полиморфных вариантов CYP3A5*3 и CYP3A4*22 на безопасность терапии ремдесивиром у пациентов с COVID-19
Хасан Базмамун, Вахид Бахрами, Голамреза Калванди,
Аббас Моради, Мохаммед Хоссейн Эсламиан,
Ирадж Шахрамян, Фатема Паруйе
Инфекция *Helicobacter pylori* (хеликобактерной инфекции) у детей, больных астмой, и её связь с тяжестью заболевания
Теммиева Л. А., Галаева Э. А.,
Камбачокова З. А., Алиева З. М., Теммиев Н. М.,
Акаев З. Х., Джабраилова М. Х., Камбачокова А. А.
Методы реабилитационного лечения у детей с задержкой психоречевого развития с аутичным спектром

Обзоры

- Андрюков Б. Г., Беседнова Н. Н., Запорожец Т. С.
Микропластик и его роль в сохранении и распространении генов резистентности к антибиотикам в морских экосистемах
Петрова Н. В., Емельянова А. Г.,
Ковальчук А. Л., Тарасов С. А.
Роль молекул МНС I и II в антибактериальном иммунитете и лечении бактериальных инфекций
Олсуфьева Е. Н., Янковская В. С.,
Дунченко Н. И.
Обзор рисков контаминации антибиотиками молочной продукции

Experimental Research

- 4 Fan Ding, Lidia G. Stoyanova, Alexander I. Netrusov
Microbiomes of Kefir Grains From Regions of Historical Origin and Their Probiotic Potential
8 Alexander V. Gurov, Kristina E. Borovkova, Kirill L. Kryshen, Lia R. Nikiforova, Julia V. Salmova
Evaluation of the Bactericidal Activity of Gramicidin S Against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates with Single and Multiple Exposure
19 Igor I. Lyubimov, Elena I. Isaeva, Elizaveta N. Vetrova, Alina V. Lavrova, Natalia M. Gretskeya, Igor V. Serkov, Vladimir V. Bezuglov, Georgy A. Galegov
Study of the Antiviral Activity of Adamantane-Containing Chemical Compounds
24 Marina V. Zhuravleva, Elizabeth A. Roshchina, Catherine A. Loseva, Alexander V. Gurov
Assessment of The Toxicological Profile of The New Dioxidine Dosage Form (Solution for Topical and External Use, 0.025%)

Clinical Research and Practice

- 33 Aleksandr N. Kulikov, Natalia V. Muravyeva, Boris S. Belov
Safety of Gam-COVID-Vac (Sputnik V) Combined Vector Vaccine in Patients With Immunoinflammatory Rheumatic Diseases: Preliminary Data
40 Vladislav M. Kolomiets, Natalia A. Polshikova, Aleksey L. Kovalenko, Elizaveta P. Pavlenko
The Problem of Comorbid Socially Significant Infections Under The Conditions of The COVID-19 Pandemic
45 Ilyas I. Temirbulatov, Alexander V. Kryukov, Karin B. Mirzaev, Natalya P. Denisenko, Sherzod P. Abdullaev, Anna S. Zhiryakova, Yuliya V. Shevchuk, Valery I. Vechorko, Oleg V. Averkov, Dmitry A. Sychev
The Effect of Carriage of CYP3A5*3 and CYP3A4*22 Polymorphic Variants on the Safety of Remdesivir Therapy in Patients with COVID-19
51 Hassan Bazmamoun, Vahid Bahrami, Gholamreza Kalvandi, Abbas Moradi, Mohammad Hossein Eslamian, Iraj shahramian, Fateme Parooie
Evaluation of *Helicobacter pylori* Infection in Asthmatic Children and Its Relationship with Severity of the Disease
57 Leila A. Temmoeva, Ellina A. Galaeva, Zareta A. Kambachokova, Zukhra M. Alieva, Nazir M. Temmoev, Zaur Kh. Akaev, Madina Kh. Dzhabrailova, Amina A. Kambachokova
Methods of Rehabilitation Treatment in Children with Delayed Psychoverbal Development Within The Autism Spectrum

Reviews

- 61 Boris G. Andryukov, Natalya N. Besednova, Tatyana S. Zaporozhets
Microplastics and Their Role in the Maintenance and Spread of Antibiotic Resistance Genes in Marine Ecosystems
71 Nataliya V. Petrova, Alexandra G. Emelyanova, Alexander L. Kovalchuk, Sergey A. Tarasov
The Role of MHC Class I and Class II Molecules in Antibacterial Immunity and Treatment of Bacterial Diseases
82 Eugenia N. Olsufyeva, Valentina S. Yankovskaya, Nina I. Dunchenko
Overview of the Risks of Antibiotic Contamination of Dairy Products

* 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.

Микробиомы кефирных зёрен из регионов исторического происхождения и их пробиотический потенциал

ФАНЬ ДИН^{1,2}, *Л. Г. СТОЯНОВА¹, А. И. НЕТРУСОВ^{1,3}

¹ Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

² Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Шэньчжэнь, КНР

³ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

Microbiomes of Kefir Grains From Regions of Historical Origin and Their Probiotic Potential

FAN DING^{1,2}, *LIDIA G. STOYANOVA¹, ALEXANDER I. NETRUSOV^{1,3}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, China

³ National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

Резюме

Кефир вызвал интерес в научном сообществе благодаря своим полезным свойствам, такими как улучшение пищеварения, антимикробное действие, гиполипидемический, антигипертензивный, противовоспалительный эффекты, контроль уровня глюкозы в плазме, антиоксидантный, антиканцерогенный и антиаллергенный активности. Дана сравнительная характеристика микробиомов кефирных зёрен (КЗ), полученных из регионов их исторического происхождения (Кавказ и Китай). Показано разнообразие их составов с помощью классических микробиологических и молекулярно-генетических методов, включая метод высокопроизводительного секвенирования V4 фрагментов генов 16S рРНК бактерий и области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК дрожжей. Из бактериальных культур в КЗ чаще всего встречаются виды рода *Lactobacillus*, а из дрожжей — *Pichia fermentans*, а также более редко встречающиеся виды *Yarrowia lipolytica* и *Galactomyces candidus*.

Ключевые слова: кефирные зёрна; выделение; идентификация; лактобактерии; дрожжи; секвенирование; 16S рРНК

Для цитирования: Дин Фань, Нетрусов А. И., Стоянова Л. Г. Микробиомы кефирных зёрен из регионов исторического происхождения и их пробиотический потенциал. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 7–8: 4–7. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-4-7>.

Abstract

Kefir has attracted interest in the scientific community due to its beneficial properties, such as: improving digestion, antimicrobial action, hypocholesterolemic, antihypertensive, and anti-inflammatory effects, control of plasma glucose levels, antioxidant, anticarcinogenic, and antiallergic activity. The comparative characteristics of the microbiomes of kefir grains (KG) obtained from the regions of their historical origin (Caucasus and China) is given. The diversity of their compositions was shown using classical microbiological and molecular genetic methods, including high-throughput sequencing of V4-region of bacterial 16S rRNA genes and the ITS1 region of the 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S complex of yeast rRNA. The species of the *Lactobacillus* genus are the most common of the bacterial cultures in kefir grains, while the most common of the yeast cultures is *Pichia fermentans*, as well as the rarer species of *Yarrowia lipolytica* and *Galactomyces candidus*.

Key words: kefir grains; isolation; identification; lactobacteria; yeast; sequencing; 16S rRNA

For citation: Ding Fan, Netrusov A. I., Stoyanova L. G. Microbiomes of kefir grains from regions of historical origin and their probiotic potential. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 7–8: 4–7. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-4-7>.

Введение

В связи с ухудшением эпидемиологической обстановки в мире увеличился спрос на продукты и безопасные препараты, полезные для здоровья. Традиционные продукты смешанного молочнокислого и спиртового брожения, включая кефир,

с древних времён зарекомендовали себя как средство для борьбы с инфекциями и преждевременной старостью. На протяжении веков кефир употребляли в качестве натурального лекарства. Питательные и лечебные свойства кефира на протяжении десятилетий находились в центре внимания многих научных исследований. Кефир

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия, 119234.
E-mail: stoyanovamsu@mail.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 1/12 Leninskiye Gory, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russian Federation.
E-mail: stoyanovamsu@mail.ru

получают путём посева кефирных зёрен в молоко. Точный микробный состав кефирных зёрен до сих пор остаётся спорным. В кефирных зёрнах обнаружено до 50 различных видов бактерий и дрожжей, которые были выделены из разных мест [1]. Наиболее распространёнными бактериям в зёрнах являются молочнокислые бактерии (МКБ), на долю которых приходится 37–90% микробной популяции [2]. Микробы, присутствующие в кефире, обладают потенциалом пробиотиков. Пробиотические культуры кефира могут активировать иммунную систему для подавления вирусных инфекций. Показано, что молочнокислые бактерии из кефира повышают цитотоксичность натуральных клеток-киллеров по отношению к опухолевым клеткам, особенно в случае рака кишечника и толстой кишки [3].

Кефир может действовать как противовоспалительное средство за счёт снижения экспрессии интерлейкинов IL-1 и IL-6, синтезируемых макрофагами и Т-клетками и стимулирующих иммунный ответ, а интерфероны IFN- α и II типа (IFN- γ) индуцируют противовирусную защиту. Под влиянием чужеродных антигенов вырабатывается повышенное количество цитокинов — медиаторов воспалительного процесса, выполняющих регуляторные функции, которые в свою очередь продуцируют повышенное образование IL-6, активацию Т-лимфоцитов и других иммунных клеток и их миграцию, приводящее к развитию признаков «цитокинового шторма» при коронавирусной инфекции. Поэтому кефир может быть важным ингибитором «цитокиновой бури», способствующей развитию COVID-19 [4, 5]. Лечебный эффект кефира в основном определяется микробным составом кефирных зёрен.

Цель исследования — сравнить микробиомы кефирных зёрен, полученных из исторически регионов их происхождения — Кавказа и Китая.

Материал и методы

Для проведения исследований получали кефирные зёрна (КЗ) из частных домохозяйств исторических регионов их происхождения, включая Северную Осетию и Тибетский район Китая. Зёрна хранили в лиофильном состоянии в коллекции культур кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Лиофилизированные КЗ активировали в стерильном 1,5% молоке с регулярными пересевами частотой 2 раза в неделю. Морфологические свойства КЗ изучали под световым микроскопом Микромед 1 (вар. 2-20, фирмы ЛОМО, СПб, РФ) и сканирующем электронном микроскопе (СЭМ, фирма «HITACHI SU-8010»). Выделение чистых культур и их дифференциацию проводили стандартными микробиологическими методами, проводя культивирование в молоке с последующим высевом накопительных культур на агаризованные среды и культивируя в аэробных и анаэробных условиях [6–8]. Состав микробиомов и их таксономическую принадлежность определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК бактерий в области V4 фрагментов генов 16S рРНК бактерий и области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК дрожжей [9, 10]. Статистическую

обработку данных проводили с использованием MS Excel. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Кефирные зёрна можно описать как студенистые белые или слегка жёлтые массы с эластичной консистенцией и размером от 0,3 до 3,5 см в диаметре, похожие на маленькие головки (кочанчики) цветной капусты (рис. 1, *a*). В электронном микроскопе видны крупные (7–8 мкм) клетки дрожжей с шпалами от отделившихся почек, и тесно прилегающие к ним клетки МКБ (1–3 мкм в длину) (рис. 1, *b*).

Кефирные зёрна имеют разнообразный состав микроорганизмов с преобладанием молочнокислых бактерий и дрожжей. Эти виды микроорганизмов подразделяются на четыре группы: гомоферментативные и гетероферментативные молочнокислые бактерии, и ассимилирующие и

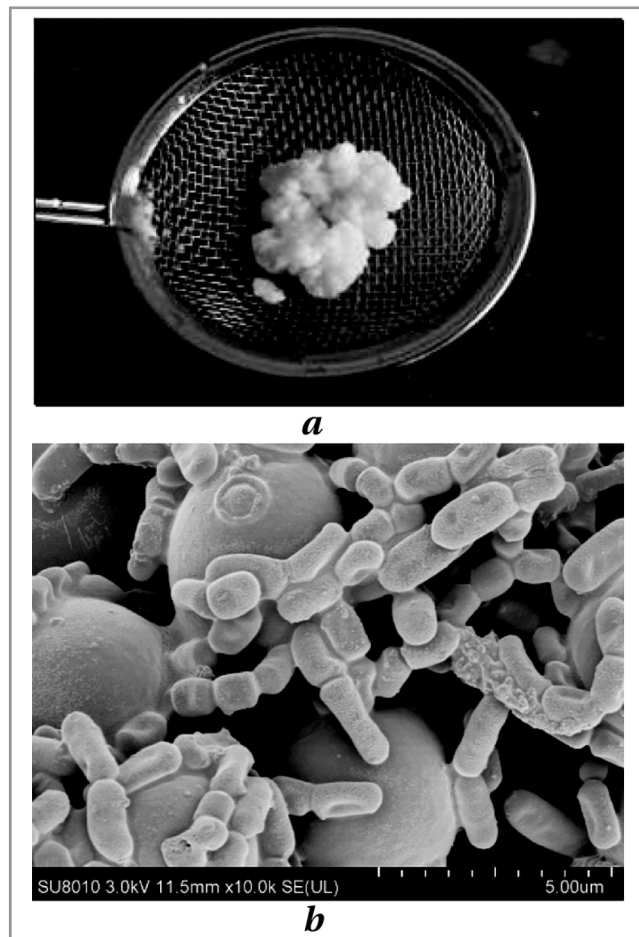


Рис. 1. Фотографии кефирного зерна из Тибета.

a — внешний вид кефирного зерна; *b* — его поверхность в сканирующем электронном микроскопе (HITACHI SU-8010, увеличение $\times 10\,000$).

Fig. 1. Photos of kefir grains from Tibet.

a — the appearance of kefir grains; *b* — its surface in a scanning electron microscope image (HITACHI SU-8010, $\times 10000$ magnification).

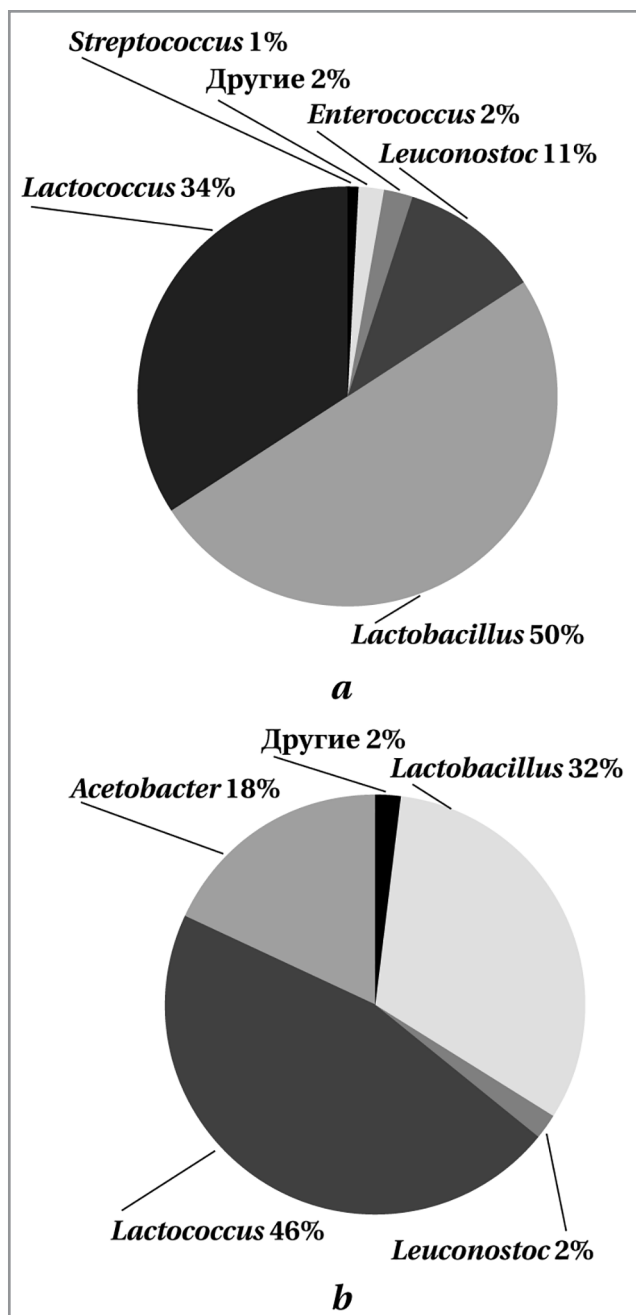


Рис. 2. Бактериальный состав микробиоты кефирных зёрен из Осетии (a) и Тибета (b).
Fig. 2. Bacterial composition of the microbiota of kefir grains from Ossetia (a) and Tibet (b).

не ассимилирующие лактозу дрожжи. Выделенные чистые культуры МКБ растут в аэробных и анаэробных условиях на среде МРС по-разному, что отражает их различную аэротолерантность.

Микробиом кефирных зёрен из Осетии и Тибета, по результатам высокопроизводительного секвенирования, представлен разными представителями МКБ в разном процентном соотношении и неодинаковым дрожжевым составом (рис. 2, 3).

В бактериальном составе КЗ идентифицированы *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*, а в Тибетском образце присутствовал *Acetobacter* (18%),

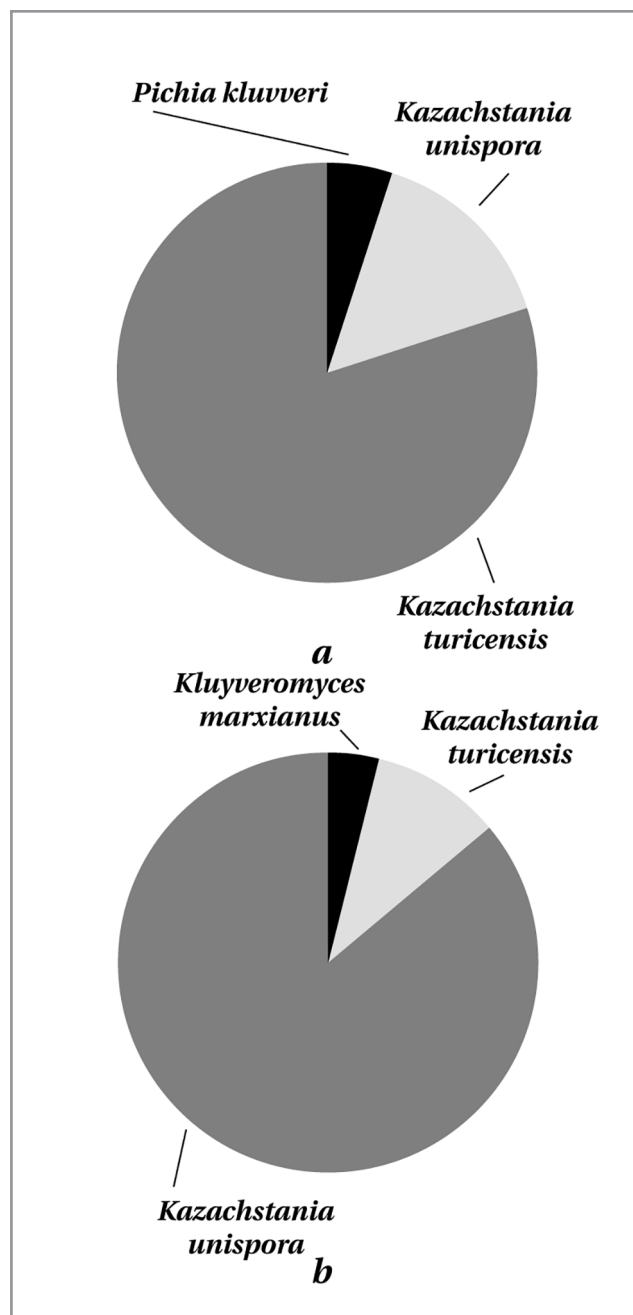


Рис. 3. Дрожжевой состав микробиоты кефирных зёрен из Осетии (a) и Тибета (b).
Fig. 3. Yeast composition of the microbiota of kefir grains from Ossetia (a) and Tibet (b).

способный окислять этанол до уксусной кислоты, ацетат и лактат — до CO_2 и H_2O .

Из КЗ чаще всего выделяются дрожжи *Pichia fermentans*, а также *Yarrowia lipolytica* (вид аскомицетовых дрожжевых грибов), относящийся к порядку *Saccharomycetales*, которые были выделены из Тибетских кефи́ров, что подтверждено работами китайских учёных [11].

Из образца кефирного зерна, полученного из Северной Осетии, выделены дрожжи *Galactomyces candidus*, редко встречающийся в КЗ.

Заключение

Во время ферментации молока зёрнами кефира образуется множество функциональных соединений, таких как биоактивные пептиды, обладающие антигипертензивной, антиоксидантной, противоаллергенной, противоопухолевой, противомикробной, противовоспалительной и снижающей уровень холестерина активностью [12]. Для большого числа штаммов, выделенных из

кефира (например, *Lactobacillus kefirianofaciens*) и дрожжей *Kluyveromyces marxianus*), значительные пробиотические действия были продемонстрированы как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo* [5]. Во многих лабораториях мира постоянно ведутся исследования по дальнейшему изучению свойств кефира для разработки новых важных функциональных продуктов, биологически активных добавок и лекарственных средств.

Литература/References

1. Prado M.R., Blandon L.M., Vandenberghe L.P.S. Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1177–1186. doi: 10.3389/fmicb.2015.01177. eCollection 2015.
2. Miguel M. G. C. P., Cardoso P. G., Lago L. A., Schwan R. F. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Res Int.* 2010; 43: 1523–1528.
3. Farag M.A., Jomaa S.A., El-Wahed A.A. The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients.* 2020; 12 (2): 346–359. doi: 10.3390/nu12020346.
4. Yamane T., Sakamoto T., Nakagaki T., Nakano Y., Yamane T., Sakamoto T., Nakagaki T., Nakano Y. Lactic acid bacteria from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells. *Foods.* 2018; 7: 48. doi: 10.3390/foods7040048.
5. Boyoglu-Barnum S., Chirkova T., Anderson L. J. Biology of infection and disease pathogenesis to guide RSV vaccine development. *Front Immunol.* 2019; 10: 1675. doi: 10.3389/fimmu.2019.01675. eCollection 2019.
6. Стоянова Л.Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием. Известия ТСХА. 2017; 5: 41–61. [Stoyanova L.G. Isolation and identification of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with antimicrobial activity. Izvestia TSHA. 2017; 5: 41–61 (in Russian)].
7. Klimko A.I., Cherdynseva T.A., Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2020; 12 (3): 1139–1148. doi: 10.1007/s12602-019-09599-6.
8. Kotova I.B., Cherdynseva T.A., Netrusov A.I. Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process. *Adv Exp Medicine, Biol.* 2016; 932: 93–121. doi: 10.1007/5584_2016_2.
9. Merkel A. Yu., Tarnovetskii I. Yu., Podosokorskaya O. A., Toshchakov S. V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities. *Microbiology.* 2019; 13 (6): 671–680.
10. Willger S.D., Grim S.L., Dolben E.L., Shipunova A., Hampton T.H., Morrison H.G., Filkins L.M., O'Toole G.A., Moulton L.A., Ashare A., Sogin M.L., Hogan D.A. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome.* 2014; 2 (1): 40. doi: 10.1186/2049-2618-2-40. eCollection 2014.
11. Gao X., Li B. Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. *Food Agric.* 2017; 1–10.
12. Amorim E.G., Coitinho L.B., Dias A.T., Friques A.G.E., Monteiro B.L., de Rezende L.C.D., Pereira T.D.M.C., Campagnaro B.P., De Pauw E., Vasquez E.C. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chem.* 2019; 282: 109–119. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.010. Epub 2019 Jan 8.

Информация об авторах

Дин Фань — аспирант кафедры микробиологии биологического факультета Московского Государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Стоянова Лидия Григорьевна — д. б. н., в. н. с. кафедры микробиологии, биологического факультета Московского Государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Нетрусов Александр Иванович — д. б. н., профессор кафедры микробиологии биологического факультета Московского Государственного университета им. М. В. Ломоносова; Факультет биологии и биотехнологии, Высшая школа экономики, Москва, Россия

About the authors

Ding Fan — Ph. D. student of the Microbiology Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Lidia G. Stoyanova — D. Sc. in biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Alexander I. Netrusov — D. Sc. in biology, Professor in biology, Lomonosov Moscow State University; National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

Оценка бактерицидной активности грамицидина С в отношении клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* при однократном и многократном воздействии

*А. В. ГУРОВ^{1,2}, К. Е. БОРОВКОВА³, К. Л. КРЫШЕНЬ³,
Л. Р. НИКИФОРОВА³, Ю. В. САЛМОВА³

¹ ФГБУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

² ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л. И. Свержевского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

³ АО «НПО «Дом Фармации», г. п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

Evaluation of the Bactericidal Activity of Gramicidin S Against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates with Single and Multiple Exposure

*ALEXANDER V. GUROV^{1,2}, KRISTINA E. BOROVKOVA³, KIRILL L. KRYSHEN³,
LIA R. NIKIFOROVA³, JULIA V. SALMOVA³

¹ Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Sverzhovsky Research Clinical Institute of Otorhinolaryngology, Moscow, Russia

³ RMC «Home of Pharmacy», Kuzmolovsky, Leningrad region, Russia

Резюме

Актуальность. Боль в горле инфекционно-воспалительного генеза является одной из наиболее распространенных причин обращения за медицинской помощью и поводом для назначения антимикробных препаратов. С учетом высокой значимости проблемы распространения микробной устойчивости к системным этиотропным препаратам, применение антимикробных пептидов (АМП) для топической терапии может являться перспективным решением благодаря особенностям механизма действия АМП.

Цель исследования — оценка формирования устойчивости к АМП грамицидина С (ГС) в отношении клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, включая штаммы, резистентные к антимикробным препаратам, в ходе многократного воздействия, приближенного к применению в клинической практике.

Материал и методы. Исследуемый объект — АМП ГС. Тестовые микроорганизмы — эталонные штаммы *S. pneumoniae* (ATCC 6303), *S. aureus* (ATCC 6538-Р) и по 10 штаммов клинических изолятов каждого вида микроорганизма, включая резистентные к антимикробным препаратам (в т. ч. MRSA). На первом этапе методом микроразведений в планшетах оценивали антимикробную активность ГС по оценке величины минимальной подавляющей и минимальной бактерицидной концентраций (МПК и МБК, соответственно). На втором этапе с использованием эталонных штаммов и по 4 клинических изолята каждого микроорганизма, включая устойчивые к антимикробным препаратам, формировали резистентность двумя способами параллельно (с жидкими и плотными средами) на протяжении 7 последовательных пассажей за 7 сут с ГС в концентрациях равных 0,5 и 1,0 МПК. Оценивали количество выживших микроорганизмов и определяли МПК и МБК на каждом пассаже.

Результаты. На первом этапе МПК ГС в отношении *S. pneumoniae* составила для 5 штаммов — 8 мкг/мл, для 5 штаммов — 16 мкг/мл, для одного — 4 мкг/мл. В отношении 10 из 11 штаммов *S. aureus*, включая MRSA, МПК ГС составила 4 мкг/мл (для 1 штамма — 8 мкг/мл). Для 4 штаммов *S. pneumoniae* МБК ГС была равна МПК (16 мкг/мл), для 7 штаммов МБК была выше МПК в 4–8 раз и в основном составила 32 мкг/мл (для 1 штамма — 64 мкг/мл). МБК в отношении 6 штаммов *S. aureus* была равна МПК (4 мкг/мл), для 5 оставшихся штаммов МБК была выше МПК в 2–8 раз, но не превышала 64 мкг/мл. На втором этапе при многократном воздействии ГС установлено, что оцениваемые величины МПК и МБК на протяжении 7 пассажей сохранились на прежнем уровне у всех штаммов, включая резистентные к антибиотикам в жидких и на плотных средах.

Выводы. Грамицидин С продемонстрировал высокую бактерицидную активность в отношении эталонных штаммов и клинических изолятов ведущих патогенных микроорганизмов *S. pneumoniae* и *S. aureus*, включая штаммы, устойчивые к системным антимикробным препаратам, при этом МПК и МБК не превышали концентраций, создаваемых при применении в клинической практике. В ходе многократного воздействия (7 пассажей за 7 сут) не было выявлено признаков формирования устойчивости тестовых штаммов патогенов, включая

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: Загородное шоссе, д. 18А, стр. 2, Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л. И. Свержевского Департамента здравоохранения города Москвы, г. Москва, Россия, 117152.
E-mail: alex9999@inbox.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 18A, p. 2, Zagorodnoye shosse, Moscow, 117152 Russia. E-mail: alex9999@inbox.ru

устойчивые к системным антимикробным препаратам из групп бета-лактамов, макролидов, фторхинолонов, тетрациклинов, аминогликозидов и др.

Ключевые слова: грамицидин С; нерибосомальные антимикробные пептиды; бактерицидное действие; антибиотикорезистентность; тонзиллофарингит

Для цитирования: Гуров А.В., Боровкова К.Е., Крышень К.Л., Никифорова Л.Р., Салмова Ю.В. Оценка бактерицидной активности грамицидина С в отношении клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* при однократном и многократном воздействии. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 7–8: 8–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-18>.

Abstract

Background. Sore throat of infectious and inflammatory origin is one of the most common reasons for the prescription of antimicrobial drugs. The use of antimicrobial peptides (AMPs) for topical therapy may be a promising solution, due to the peculiarities of AMPs' mechanism of action, taking into account the high importance of microbial resistance spread problem in relation to systemic etiotropic drugs.

The aim of the study was to assess the formation of resistance to AMP Gramicidin S (GS) of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, including strains resistant to antimicrobial drugs during repeated exposure, in the setting close to their actual use in clinical practice.

Materials and methods. The object under study is AMP GS. The test microorganisms are reference strains of *S. pneumoniae* (ATCC 6303), *S. aureus* (ATCC 6538-P), and 10 strains of clinical isolates of each type of microorganisms, types with antimicrobial resistance (including MRSA). At the first stage, the antimicrobial activity of GS was evaluated by the method of microdilutions in plates by estimating the value of the minimum inhibitory and the minimum bactericidal concentrations (MIC and MBC, respectively). At the second stage, using reference strains and 4 clinical isolates of each microorganism, including types with antimicrobial resistance, resistance was formed in two ways simultaneously (with liquid and solid media) for 7 consecutive passages over 7 days with GS at concentrations equal to 0.5 and 1.0 MIC. The number of surviving microorganisms was estimated and the MIC and MBC were determined at each passage.

Results. At the first stage, the MIC of GS in relation to *S. pneumoniae* was 8 µg/ml for 5 strains, 16 µg/ml for 5 strains, and 4 µg/ml for one. For 10 out of 11 strains of *S. aureus*, including MRSA, the MIC of GS was 4 µg/ml (for 1 strain — 8 µg/ml). For 4 strains of *S. pneumoniae*, MBC of GS was equal to MIC (16 µg/ml), for 7 strains MBC was 4–8 times higher than MIC, and mostly amounted to 32 µg/ml (for 1 strain — 64 µg/ml). MBC for 6 strains of *S. aureus* was equal to MIC (4 µg/ml), for the 5 remaining strains MBC was 2–8 times higher than MIC, but did not exceed 64 µg/ml. At the second stage, it was found that the estimated values of GS MIC and MBC with repeated exposure to GS remained at the same level for 7 passages in all strains, including those resistant to antibiotics in liquid and solid media.

Conclusions. Gramicidin S demonstrated high bactericidal activity against reference strains and clinical isolates of leading pathogenic microorganisms *S. pneumoniae* and *S. aureus*, including strains resistant to systemic antimicrobial drugs, while MIC and MBC did not exceed concentrations contained in single doses of drugs used in clinical practice. During repeated exposure (7 passages in 7 days), there were no signs of the formation of resistance of test strains of pathogens, including those resistant to systemic antimicrobial medicines from the groups of beta-lactams, macrolides, fluoroquinolones, tetracyclines, aminoglycosides, etc.

Keywords: Gramicidin S, nonribosomal antimicrobial peptides, bactericidal action, antibiotic resistance, tonsillopharyngitis

For citation: Gurov A.V., Borovkova K.E., Kryshen K.L., Nikiforova L.R., Salmova Yu.V. Evaluation of the bactericidal activity of gramicidin S against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* clinical isolates with single and multiple (course) exposure. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 7–8: 8–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-18>.

Одной из самых распространённых причин обращения взрослого и детского населения за амбулаторной медицинской помощью (к оториноларингологу, терапевту, педиатру и врачу общей практики) являются инфекционно-воспалительные заболевания ротоглотки (острый фарингит, острый тонзиллит, тонзиллофарингит, а также обострения указанных заболеваний) [1].

Несмотря на разнообразие клинических форм очаговой инфекции глотки, одна из ведущих ролей в терапии данных состояний отводится местным (топическим) препаратам, направленным в первую очередь на быструю и полную эрадикацию возбудителя, а также решающим задачи купирования воспалительного и болевого синдрома. Наибольшая эффективность при применении топических препаратов достигается благодаря комбинированному воздействию непосредственно в очаге воспаления [2].

Внедрение в микробиологическую практику молекулярных методов и, прежде всего секвенирования, позволило существенно расширить представления о микробиоте дыхательных путей и возбудителях респираторных инфекций. Данные методы меняют представления об этиологии заболеваний, которые ранее подразделялись на преимущественно вирусные или бактериальные. В целом, результаты исследований, выполненных с помощью наиболее современных методов, хотя и повышают значимость вирусов в этиологии острых инфекций дыхательных путей, подтверждают, что ведущую роль среди бактерий играют традиционные патогены, а также указывают на значимость вирусно-бактериальных ассоциаций. Определяясь с составом эмпирической терапии, и в первую очередь, выбирая препараты с этиотропной активностью, необхо-

димо руководствоваться принципом «разумной минимальной достаточности» [3].

За последние десятилетия распространённость устойчивости бактериальных возбудителей инфекций к антимикробным средствам достигла уровня одной из наиболее серьёзных угроз для здоровья человечества [4]. Несмотря на то, что описано значительное разнообразие биохимических механизмов её реализации, принципиально значимыми являются две основные группы генетических механизмов формирования резистентности: мутации в собственном геноме и приобретение генов резистентности в результате горизонтального переноса. Кроме формирования резистентности, у бактерий есть и другие механизмы противодействия антимикробным средствам, например, персистентность, при которой формируется значительное снижение метаболической активности микроорганизма. Оценивая перспективы преодоления резистентности и других механизмов формирования устойчивости, следует признать, что с эволюционной точки зрения создание средств, воздействующих на возбудителя инфекции при полном отсутствии риска формирования резистентности, крайне маловероятно. Более реалистичный подход – это разработка препаратов, действующих одновременно на несколько мишеней [5].

В этой связи, антимикробные пептиды (АМП) в последнее время рассматриваются в качестве перспективных средств для лечения инфекционных заболеваний. Например, применение веществ из группы грамицидинов одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для использования против инфекций, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями [6].

Грамицидин С (ГС) является нерибосомальным циклическим декапептидом бактериального происхождения с выраженным многонаправленным бактерицидным действием в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий и некоторых дрожжевых грибов. ГС активен против планктонных форм микроорганизмов, включая клетки-персистеры, и биоплёнок [6–12].

В период сентября–декабря 2021 г. специалистами АО «НПО «Дом фармации» по инициативе компании «Валента Фарм» было осуществлено комплексное исследование, посвящённое оценке противомикробной активности ГС, а также оценке формирования резистентности у ряда патогенов

в условиях многократного воздействия в различных концентрациях в отношении ГС, который входит в состав группы топических лекарственных препаратов для терапии инфекционно-воспалительных заболеваний глотки, выпускаемой в Российской Федерации фармацевтической компанией «Валента Фарм»¹.

Цель исследования — оценка формирования устойчивости к ГС ведущих бактериальных возбудителей респираторных инфекций при многократном повторном воздействии.

Для достижения указанной цели определяли минимальные подавляющие и минимальные бактерицидные концентрации (МПК и МБК, соответственно) ГС в отношении штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus* при однократном воздействии, выявляли выжившие микроорганизмы при многократном воздействии исследуемого объекта и определяли МПК и МБК ГС в отношении выживших микроорганизмов.

Материал и методы

*Изучение антимикробной активности грамицидина С в отношении штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus* при однократном воздействии*

В качестве исследуемого объекта использовали грамицидин С гидрохлорид (активная фармацевтическая субстанция, «Biotika a.s.», Словакия, серия № 1907107, срок годности: до 07.2023). С учётом цели исследования в качестве тест-системы для исходного определения МПК и МБК использовались грамположительные микроорганизмы из рабочей коллекции музея лаборатории микробиологии АО «НПО «Дом фармации» (по одному эталонному штамму *S.pneumoniae* и *S.aureus* — ATCC 6303 и ATCC 6538-Р, соответственно), а также по 10 штаммов клинических изолятов каждого микроорганизма с охарактеризованной устойчивостью к антибактериальным препаратам различной степени широты из коллекции ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России (табл. 1).

Определение МПК

МПК ГС определяли методом серийных разведений в бульоне Mueller–Hinton (Sigma, США), а для штаммов *S.pneumoniae* инокулюм разводили в бульоне Mueller–Hinton с добавлением лизированной лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) [13, 14]. Контролировали окончательную концентрацию количества клеток в лунках планшета с учётом разведения исследуемым объектом в диапазоне от 2×10^5 КОЕ/мл до 8×10^5 КОЕ/мл. Результаты с планшетов учитывали визуально в проходящем свете при условии, что контрольные лунки подтвердили правильность поставленного эксперимента. МПК тестируемого объекта соответствовала лунка с наименьшей концентрацией тестируемого объекта без признаков видимого роста тест-микроорганизмов (прозрачный бульон) [13].

Определение МБК

МБК ГС определяли путём высевов со всех лунок, в которых не обнаруживалось видимого роста бактерий на плотной питательной среде Mueller–Hinton agar (Merck KGaA, Германия), а для штаммов *S.pneumoniae* высевы были сделаны на Mueller–Hinton agar с добавлением дефибрированной бараньей крови с окончательной концентра-

¹ Граммидин, спрей для местного применения — РУ № ЛП-004460; Граммидин детский, таблетки для рассасывания — РУ № ЛП-002179; Граммидин детский, спрей для местного применения — РУ № ЛП-004699; Граммидин нео, таблетки для рассасывания — РУ № ЛСР-010598/08; Граммидин с анестетиком, спрей для местного применения — РУ № ЛП-005219; Граммидин с анестетиком нео, таблетки для рассасывания — РУ № ЛСР-005119/08.

Таблица 1. Штаммы микроорганизмов, использовавшихся в качестве тест-систем

Table 1. Strains of microorganisms used as test systems

Серотип	Номер изолята	Возраст источника, лет / Год выделения	Материал	Диагноз	Резистентность в отношении:	Дополнительные свойства
<i>Streptococcus pneumoniae</i>						
ATCC 6303*	—	—	—	—	—	—
23F	2*	9 лет	Мкр	Хронический бронхит	—	—
3	24	16 лет	Пбп	Острый, средний отит	—	—
18ABCF	29*	2 года	Мрг	Носитель	—	—
14	61*	4 года	Мрг	Носитель	—	—
19F	109	7 лет	Мнг	ОРЗ	—	—
12ABF/44/46	247	5,6 лет	Мнг	Носитель	—	—
6ABCD	277	4,9 года	Мнг	Носитель	—	—
4	711/58*	37 лет	Кровь	Сепсис, пневмония	2, 4	—
1	1356	10,3 года	Мкр	Пневмония	—	—
11AD	3184	1 год	Мкр	Носитель	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>						
ATCC 6538-P*	—	—	—	—	—	—
—	74	2012 г.	Ро	—	1, 2, 4, 5, 7, 9	MRSA, mecA, SCCmec IA, Agr II, MLST 228, spa t041
—	77	2012 г.	Ро	—	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9	MRSA, mecA, SCCmec IVce, Agr I, MLST 8, spa t008
—	85	2012 г.	Ро	—	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec III-ccrC, Agr I, MLST 239, spa t631
—	134	2013 г.	Ро	—	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec IV, Agr IV, PVL-S +, MLST 121, spa t308
—	135	2013 г.	Ро	—	1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec III-ccrC, Agr I, MLST 239, spa t037
—	176*	2014 г.	Кровь	—	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec IIImer, Agr I, tsst-1 +, MLST 239, spa t037
—	299*	2015 г.	Пвж	—	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9	MRSA, mecA, SCCmec IA, Agr II, MLST 228, spa t041
—	402	2016 г.	Ро	—	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10	MRSA, mecA, SCCmec IVA, Agr I, MLST 398, spa t011
—	758*	2019 г.	Мнг	Носитель	1, 2	MRSA, mecA, SCCmec IVce, Agr I, tsst-1 +, MLST 22, spa t223
—	952*	2019 г.	Мнг	Носитель	—	MSSA, отр, SCCmec IV, Agr IV, PVL-S +, MLST 121, spa t2524

Примечание. * — штаммы, используемые на этапе оценки развития резистентности в отношении ГС при многократном воздействии. Сокращения: мкр — мокрота; пбп — пунктат барабанной полости; мрг — мазок из ротоглотки; мнг — мазок из носоглотки; ро — раневое отделяемое; пвж — промывные воды желудка; 1 — цефокситин; 2 — оксациллин; 3 — хлорамфеникол; 4 — эритромицин; 5 — клиндамицин; 6 — рифампицин; 7 — гентамицин; 8 — мупироцин; 9 — моксифлоксацин; 10 — тетрациклин. MRSA — метициллинорезистентные штаммы *S.aureus* (methicillin-resistant *S.aureus*). MSSA — метициллиночувствительные штаммы *S.aureus* (methicillin sensitive *S.aureus*).

Note. * — strains used at the stage of assessing the development of resistance to Gramicidin S with multiple exposure. Мкр — sputum; пбп — puncture sample from the tympanic cavity; мрг — smear from the oropharynx; мнг — smear from the nasopharynx; ро — wound discharge; пвж — gastric lavage; 1 — ceftiofur; 2 — oxacillin; 3 — chloramphenicol; 4 — erythromycin; 5 — clindamycin; 6 — rifampicin; 7 — gentamicin; 8 — mupirocin; 9 — moxifloxacin; 10 — tetracycline; MRSA — methicillin-resistant *S.aureus*. MSSA — methicillin-sensitive *S.aureus*.

цией 5,0% (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) [15]. Результаты учитывали, визуально оценивая рост бактериальных штаммов на питательной среде. МБК тестируемого объекта соответствовала чашка Петри с наименьшей концентрацией тестируемого объекта и с полным отсутствием роста тест-микроорганизмов [15–19]. С учётом того, что исходная посевная доза находилась в диапазоне $2-8 \times 10^5$ КОЕ/мл, а предел обнаружения роста бактерий при использовании метода визуального контроля составляет примерно 10^1 КОЕ/мл, в случае выявления отсутствия роста регистрировалось уменьшение концентрации присутствующих бактерий не менее, чем на 99,9% (3 log) [16, 18, 19].

Изучение формирования устойчивости штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus* в отношении Грамицидина С при многократном воздействии

В качестве тестовых систем использовали эталонные штаммы и по 4 клинических изолята *S.pneumoniae* и *S.aureus* (см. табл. 1). Для селекции устойчивости исследуемые микроорганизмы пассировали на жидких (Mueller-Hinton бульон, (Sigma, США) и плотных (Mueller-Hinton agar, Merck KGaA, Германия) питательных средах, содержащих ГС в концентрациях 0,5 и 1,0 МПК. Для *S.pneumoniae* к среде добавляли дефибрированную баранью кровь (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) до окончательной концентрации 5,0%. Осуществляли 7 пересевов с ин-

тервалом 24 ч с целью оценки многократного воздействия ГС на микроорганизмы в форме суспензии клеток и в колониях.

На каждом пассаже контролировали конечную посевную дозу клеток, которая была выше, чем в первом этапе – 1×10^8 микробных клеток на чашку Петри и пробирку, для обеспечения дальнейших пересевов на среды и постановки теста на определения МПК.

В ходе исследования определяли количество выживших микроорганизмов в каждом пассаже, далее у выживших микроорганизмов определяли МПК и МБК в отношении ГС методами, описанными выше. Полученные значения МПК и МБК выживших микроорганизмов сравнивали с их начальными значениями, установленными в ходе выполнения первых этапов исследования.

Определение МПК проводили, используя диапазон конечных концентраций ГС от 256 мкг/мл до концентрации, равной МПК, выявленной для каждого штамма на первом этапе исследования. Для определения МПК использовали все штаммы, выжившие на чашках Петри с 1,0 МПК ГС (только 1-й пассаж, в остальных пассажах роста не наблюдали) и 0,5 МПК (для всех пассажей), а также все штаммы, выжившие в пробирках с 1,0 МПК ГС (для всех пассажей) и 0,5 МПК (для удобства использовали только штаммы с 7-го пассажа, поскольку в отличие от эксперимента на плотных средах, во всех пробирках с концентрацией исследуемого объекта, равной 1,0 МПК, отмечался рост микроорганизмов). Для определения МБК использовали высевы со всех лунок, в которых не обнаружено видимого роста бактерий.

Полученные результаты анализировали с использованием методов описательной статистики.

Результаты

Определение МПК и МБК

Контроль посевной дозы подтвердил необходимое количество клеток, вносимых в лунки планшетов в диапазоне от 2×10^5 КОЕ/мл до 8×10^5 КОЕ/мл. Результаты оценки МПК и МБК ГС в отношении штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus*, включая метициллинорезистентные штаммы, представлены в табл. 2.

В ходе исследования было установлено, что ГС обладает бактериостатическим (останавливает рост культуры) и бактерицидным (вызывает полную гибель бактериальных клеток) действием. В отношении штаммов *S.pneumoniae* (2 серотип 23F, 24 серотип 3, 29 серотип 18ABCF, 247 серотип 12ABF/44/46,) — 4 штамма из 11, а также в отношении *S.aureus* (ATCC 6538-P, 135, 176, 402, 758, 952) — 6 из 11 штаммов — МПК и МБК не различались между собой и составляли 16 мкг/мл и 4 мкг/мл для первого и второго микроорганизма, соответственно. В отношении 6 штаммов *S.pneumoniae* и 3 штаммов *S.aureus* МБК не превышала МПК более, чем в 4 раза. Полученные результаты показали высокую бактерицидную активность ГС в отношении данных штаммов.

Изучение формирования устойчивости штаммов *S.aureus* и *S.pneumoniae* в отношении грамицидина С на фоне многократного воздействия

Оценка выживших микроорганизмов

После 1-го пассажа наблюдали рост у всех штаммов *S.aureus* и *S.pneumoniae* на чашках Петри

с концентрациями ГС, равными 0,5 МПК. В концентрациях, равных 1,0 МПК, рост единичных колоний на чашках Петри наблюдали для штаммов микроорганизмов, для которых МБК было в 4–8 раз большей, чем МПК. У штаммов, для которых было установлено, что значения МПК и МБК равны, рост на чашках Петри с концентрациями ГС, равными МПК, отсутствовал.

После 2-го пассажа и далее, на протяжении всего семидневного цикла, наблюдали рост у всех штаммов *S.aureus* и *S.pneumoniae* на чашках Петри с концентрациями 0,5 МПК. При этом количество выживших микроорганизмов увеличивалось после первого пассажа и составляло в диапазоне от 10 до 500 КОЕ, после седьмого пассажа рост составлял более 1000 КОЕ. На чашках Петри с концентрациями ГС, равными 1,0 МПК, не наблюдали роста у всех штаммов микроорганизмов, в том числе у штаммов, выживших после 1-го пассажа. Отсутствие роста во 2-м пассаже может свидетельствовать о том, что ослабленные единичные колонии в условиях стресса (пересев на среду с антибиотиком) не смогли приспособиться к данным условиям.

Таким образом, за семь циклов пассажей на чашках Петри было получено 38 штаммов *S.pneumoniae* и 36 штаммов *S.aureus*.

Параллельно с чашками Петри ставили пробирки с ГС в тех же концентрациях. После 1-го пассажа в пробирках с концентрацией 0,5 МПК ГС наблюдали помутнение среды, как и в пробирках с контролем роста микроорганизма. Для количественного учёта роста микроорганизмов из всех пробирок делали высевы на чашки Петри. При высевах на чашки Петри был обнаружен обильный рост микроорганизмов из пробирок с концентрациями равными 0,5 и 1,0 МПК. Таким образом, за семь циклов пассажей из пробирок было получено 70 штаммов *S.pneumoniae* и 70 штаммов *S.aureus*.

Результаты по определению МПК и МБК у выживших микроорганизмов на фоне многократного воздействия грамицидином С

После инкубации в термостате чашек Петри контроль посевной дозы подтвердил необходимое количество клеток, вносимых в лунки планшетов в диапазоне от 2×10^5 КОЕ/мл до 8×10^5 КОЕ/мл [13].

МПК ГС в отношении выживших штаммов *S.pneumoniae* ATCC 6303 составила 4 мкг/мл, в отношении выживших штаммов *S.pneumoniae* 61 серотип 14 составила 8 мкг/мл. МПК ГС в отношении штаммов *S.pneumoniae* 2 серотип 23F, *S.pneumoniae* 29 серотип 18ABCF и *S.pneumoniae* 711/58 серотип 4 составила 16 мкг/мл. МПК ГС в отношении выживших штаммов *S.aureus* ATCC 6538-P, *S.aureus* 758, *S.aureus* 176 и *S.aureus* 952 составила 4 мкг/мл. В отношении выживших штаммов *S.aureus* 299, МПК ГС составила 8 мкг/мл.

МБК ГС в отношении штаммов *S.pneumoniae* 2 серотип 23F, *S.pneumoniae* 29 серотип 18ABCF со-

Таблица 2. Количество клеток в лунках планшетов при определении МПК и результаты оценки противомикробной оценки ГС, по данным первого этапа исследования

Table 2. The number of cells in the plates' wells when determining the MIC and the results of the evaluation of the antimicrobial assessment of Gramicidin C according to the first stage of the study

Штаммы/серотипы/ изоляты микроорганизмов	Посевная доза, КОЕ/мл	МПК ГС, мкг/мл (бактериостатическое действие)	МБК ГС, мкг/мл (бактерицидное действие)	МБК/МПК кратность
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				
ATCC 6303*	$5,8 \times 10^5$	4	32	8
5 штаммов: 61 серотип 14*, 109 серотип 19F, 277 серотип 6ABCD, 1356 серотип 1, 3184 серотип 11AD	$4,3 \times 10^5$ – $6,5 \times 10^5$	8	32	4
4 штамма: 2 серотип 23F*, 24 серотип 3, 29 серотип 18ABCF*, 247 серотип 12ABF/44/46	$4,9 \times 10^5$ – $6,7 \times 10^5$	16	16	1
711/58 серотип 4*	$6,1 \times 10^5$	16	64	4
<i>Staphylococcus aureus</i>				
6 штаммов: ATCC 6538-P*, 135, 176*, 402, 758*, 952*	$4,7 \times 10^5$ – $7,1 \times 10^5$	4	4	1
77	$6,6 \times 10^5$	4	8	2
2 штамма: 74, 134	$7,1 \times 10^5$ – $7,5 \times 10^5$	4	16	4
85	$6,9 \times 10^5$	4	32	8
299*	$4,2 \times 10^5$	8	64	8

Примечание. * — штаммы, используемые на этапе оценки развития резистентности в отношении ГС при многократном воздействии.

Note. * — strains used at the stage of assessing the development of resistance to Gramicidin S with multiple exposure.

ставила 16 мкг/мл, в отношении штаммов ATCC 6303 и 61 серотип 14 МБК составила 32 мкг/мл, в отношении штамма 711/58 серотип 4 — 64 мкг/мл. МБК ГС в отношении выживших штаммов *S. aureus* ATCC 6538-P, 176, 758 и 952 составила 4 мкг/мл. В отношении штаммов *S. aureus* 299 МБК ГС составила 64 мкг/мл.

Таким образом, МПК и МБК в отношении выживших в процессе многократного воздействия ГС (7 пассажей за 7 сут в подавляющих и субподавляющих концентрациях) штаммов *S. pneumoniae* и *S. aureus* как в жидких, так и на плотных средах сохранялись на исходных уровнях на всём протяжении исследования (во всех пассажах).

Обсуждение

В условиях растущей настороженности в связи с распространением устойчивости бактериальных возбудителей инфекций к классическим системным антибиотикам и противомикробным средствам, антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются в качестве многообещающих средств для лечения инфекционных заболеваний, в том числе, в формах для топического применения. Особое значение данная перспектива приобретает в отношении лечения респираторной патологии, в частности, заболеваний, сопровождающихся болью в горле [20].

Среди грамположительных патогенов наибольшую угрозу представляет *S. aureus*, включённый в

группу основных нозокомиальных условно-патогенных микроорганизмов (группа ESKAPE), характеризующихся широким распространением штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и высокой клинической значимостью [21].

В отличие от линейных грамицидинов (А, В, С и D, как смесь А–С), открытых в 1939 г. в США Рене Дюбо (René Jules Dubos) в составе противомикробных полипептидов, продуцируемых бактерией *Aneurinibacillus migulanus* (прежнее название — *Bacillus brevis*) [22], циклический декапептид грамицидин С (gramicidin S) был выделен Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражниковой из *Aneurinibacillus migulanus* и описан в сороковых годах 20-го века [23, 24]. Симметричная структура молекулы, синтезируемой нерибосомальным путём, представляет собой дважды повторяющуюся последовательность из пяти аминокислот (4 — «канонические» протеиногенные — L-валин, L-лейцин, D-фенилаланин, L-пролин и 1 — неканоническая — L-орнитин), расположенных антипараллельно и образующих жёсткое кольцо. Пептид обладает амфифильностью за счёт содержания катионной и гидрофобной частей. Физико-химические и фармакологические свойства, а также бактерицидные механизмы действия ГС в настоящее время детально изучены и подтверждены в ходе большого числа исследований [25–54].

Высокая стабильность молекулы в совокупности с наличием неканонической аминокислоты

позволяет ГС сохранять бактерицидное действие в широком диапазоне pH и избегать протеолитической деградации обычными протеазами [25, 31].

Основным способом реализации противобактериального действия ГС является нарушение строения и функции липидного бислоя плазматической мембраны бактерий, вплоть до образования значительных дефектов в высокой концентрации. Данной активности соответствует изменение потенциала и текучести мембраны клетки, а также массивный выход K^+ через цитоплазматическую мембрану, причём, как у грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов [26]. Кроме того, ГС вызывает кластеризацию и отщепление мембранных белков, нарушая процессы клеточного дыхания (фосфолипидсинтазы PlsX, MurG, цитохрома C), синтеза фосфолипидов и пептидогликана, а также процессов деления (MinD и DivIVA) [9, 10, 27–29].

Механизм действия ГС по целому ряду аспектов — влияние на биосинтез и на целостность клеточной мембраны, изменение мембранного потенциала, делокализация белка MinD-GFP, активация быстрой потери калия, индукция белков-маркёров мембранного стресса LiaH и TrmB — схож с низином (бактериоцин, продуцируемый стрептококками группы N, такими как *Lactobacillus lactis*) [30].

Дополнительно показано, что ГС способен проникать в клетки грамположительных энтерококков, и в частности *S.aureus*, непосредственно через плазматическую мембрану (т.е. без использования механизмов эндоцитоза) с последующим связыванием некоторых нуклеотидов и аденозинфосфатов [10, 31–33]. В МПК на бактериальную клетку приходится около $1,3 \times 10^6$ молекул ГС, что достаточно, чтобы покрыть поверхность клетки. Показано, что в концентрации, соответствующей МПК, протопласты *B.subtilis* связывали около 80% молекул ГС от количества молекул, связанных с интактными клетками, что указывает на то, что большая часть добавленного пептида связывается с внутренней мембраной бактерий, а не с клеточной стенкой [6]. При этом поглощение ГС во всех случаях увеличивает проницаемость клеток и протопластов и ингибирует поглощение аминокислот или глюкозы. Ключевой мишенью действия ГС в этом случае может быть алармон prGpp, который инициирует и регулирует образование биоплёнок [34, 35]. Эта особенность действия ГС, по всей видимости, обеспечивает его способность эффективно ингибировать бактериальную стрессовую реакцию и препятствовать формированию биоплёнок.

Крайне высокая протеолитическая стабильность, а также множественные механизмы бактерицидного действия, очевидно, лежат в основе отсутствия случаев регистрации у микроорганиз-

мов приобретённой резистентности в отношении ГС. В настоящее время в клинической практике практически отсутствуют указания на выявление резистентных к ГС штаммов патогенных микроорганизмов [9, 31, 36, 37].

Следует отметить, что полученные в лабораторных условиях в ходе целенаправленного эксперимента с применением искусственной индукции штаммы *S.aureus* 209P со сниженной чувствительностью к ГС сохраняли чувствительность к другим антибактериальным препаратам, но обладали пониженной на 30% дыхательной активностью. У данных штаммов по сравнению с чувствительными штаммами была на 25–30% ниже активность эндогенных ДФИ-редуктаз и НАДФ-дегидрогеназ мембран. Скорость транспорта аминокислот в клетки со сниженной чувствительностью к тестируемому веществу была значительно ниже скорости транспорта аминокислот в клетки чувствительного штамма. Это подтверждает точку зрения, что приобретение бактериями устойчивости к антимикробным пептидам требует больших затрат энергии или существенных изменений в липидном бислое, что делает развитие устойчивости неблагоприятным для дальнейшего выживания и сохранения высокой вирулентности [36, 38, 39].

Согласно данным, опубликованным за последние 40 лет, показана высокая бактерицидная активность ГС в отношении грамотрицательных бактерий, включая *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и др., с МПК в диапазоне 4–64 мкг/мл. Более активен ГС в отношении грамположительных микроорганизмов: *B.subtilis*, а также патогенные *S.aureus*, включая MRSA и другие резистентные штаммы, энтерококки (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), листерии и др. [40–54]. МПК ГС в отношении *S.aureus*, начиная с 1981 г., стабильно сохраняется на уровне, не превышающем 8 мкг/мл. По данным S. Derbal и соавт. [47], ГС подавляет рост в отношении стрептококков (*Streptococcus pyogenes* штамм 5448 и *Streptococcus agalactiae* штамм COH1) в концентрации <10 мкг/мл. Данные о МПК/МБК ГС в отношении пневмококков в доступной литературе найти не удалось.

В проведённом нами исследовании МПК ГС в отношении *S.aureus* не превышала 8 мкг/мл, в том числе у клинических изолятов, характеризующихся множественной резистентностью в отношении нескольких групп классических антимикробных препаратов для системного действия (MRSA штаммы 74, 77, 85, 134, 135, 176, 299, 402), что позволяет в очередной раз сделать вывод об отсутствии устойчивости данного микроорганизма к ГС.

Исследование показало, что различие между МБК и МПК ГС в отношении тестовых микроорга-

низмов не превышало 8 раз, причём, в отношении 4 из 11 исследованных штаммов *S.pneumoniae* и в отношении 6 из 11 исследованных штаммов *S.aureus* для достижения полного бактерицидного эффекта не требовалось повышать МПК, а в отношении 10 штаммов *S.pneumoniae* и 9 штаммов *S.aureus* МБК не превышала МПК более, чем в 4 раза, что также отражает высокий противомикробный потенциал бактерицидного уровня ГС.

В ходе многократного курсового воздействия ГС — 7 пассажей за 7 сут (в клинической практике лекарственные препараты, содержащие ГС, применяются в течение 7 дней в разовой дозе 1600–3200 мкг по 3–4 раза в сутки), было выявлено, что при ежедневном воздействии ГС на тестовые микроорганизмы в концентрациях, равных 1,0 МПК, ряд штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus* прекращал рост на плотных средах даже после 1-го пассажа, для чего параллельно осуществлялись эксперименты с концентрацией, равной 0,5 МПК. Согласно полученным результатам, при многократном воздействии ГС на культуры тестовых микроорганизмов, включая резистентный к оксациллину и эритромицину штамм пневмококка, а также MRSA и MSSA штаммы золотистого стафилококка, в концентрациях, равных МПК, а также в субподавляющих концентрациях (0,5 МПК) не было получено ни одного резистентного штамма на всём протяжении эксперимента (на чашках Петри и в пробирках). Представленные результаты подтверждают опубликованные данные многочисленных исследований, что антимикробный пептид ГС, благодаря своему механизму действия, обладает выраженной бактерицидной активностью в отношении основных возбудителей респираторных инфекций (*S.pneumoniae* и *S.aureus*), в том числе, обладающих устойчивостью к широко применяемым системным антибиотикам и противомикробным средствам. В условиях многократного ежедневного воздействия ГС не было выявлено признаков формирования резистентности у тестовых микроорганизмов.

Отдельно следует остановиться на результатах оценки антимикробной активности ГС, полученных при изучении формирования устойчивости на жидких и плотных средах. Известно, что в планктонном состоянии в суспензионных культурах клетки микроорганизма характеризуются большой площадью контакта с окружающей средой, в том числе, в отношении веществ с антимикробной активностью. В то же время, бактерии в колониях, выращенных на плотных средах, находятся в тесном контакте между собой, что существенно снижает суммарную площадь контакта клеток с окружающей средой. По мере роста колонии отдельные клетки начинают дифференцироваться по целому ряду характеристик. Так, бактерии, расположенные в разных зонах коло-

нии (центр и периферия), могут различаться по спектру экспрессируемых генов и по своей метаболической активности (явление фазовой диссоциаций бактерий), при этом в некоторых зонах индуцируется формирование покоящихся форм микроорганизмов. С учётом этого часть бактериальных клеток в колонии может обладать существенно более высокой устойчивостью к веществам с антимикробной активностью [55]. В проведённом исследовании МПК и МБК ГС в отношении тестовых микроорганизмов не различались в экспериментах, проведённых на жидких и плотных средах. Это также позволяет подтвердить высокую степень бактерицидной активности ГС в отношении микроорганизмов, которым свойственно быстрое созревание колоний и формирование биоплёнок. Проведённое исследование позволяет также наметить направления для дальнейших исследований: в настоящем исследовании в качестве тестовых использовались только два микроорганизма, хотя и относящихся к группе ведущих по значимости патогенов. Кроме того, данное исследование не позволило охватить вопросы воздействия ГС на биоплёнки.

Выводы

1. МПК грамицидина С в отношении штаммов *S.pneumoniae* находилась в диапазоне от 4 до 16 мкг/мл, а в отношении штаммов *S.aureus* была определена в диапазоне от 4 до 8 мкг/мл и не различалась в отношении MSSA и MRSA штаммов.

2. МБК грамицидина С находилась в диапазонах 16–64 мкг/мл и 4–64 мкг/мл в отношении штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus*, соответственно, и в подавляющем большинстве наблюдений не превышала МПК более, чем 4 раза, что характеризует грамицидин С как вещество с выраженным бактерицидным действием.

3. В течение семидневного цикла пассажей микроорганизмов с подавляющими и субподавляющими концентрациями грамицидина С величины МПК и МБК не изменялись по сравнению с исходным уровнем в течение всего исследования.

4. Клинические изоляты микроорганизмов, обладающие множественной устойчивостью к широко применяемым в клинической практике системным антибиотикам и противомикробным средствам (группы бета-лактамов, макролидов, респираторных фторхинолонов, тетрациклинов, аминогликозидов и др.), также как и эталонные штаммы, не отличались по чувствительности к грамицидину С при однократном воздействии и не приобретали резистентность при многократном применении.

5. Грамицидин С проявляет одинаково высокую антимикробную активность при много-

кратном воздействии на культуры штаммов *S.pneumoniae* и *S.aureus*, выращиваемые на жидких и на плотных средах, что свидетельствует о способности грамицидина С оказывать бактерицидное действие на организованные колонии патогенов, обладающих факторами повышенной устойчивости к действию классических системных антибактериальных средств.

6. Таким образом, последовательный пересев микроорганизмов на протяжении 7 дней в средах, содержащих грамицидин С, не приводит к изменению величин МПК и МБК по сравнению с исходными значениями на всём протяжении многократного воздействия, что свидетельствует об отсутствии признаков формирования устойчивости при рекомендованном в клинической практике применении.

Дополнительная информация

Участие авторов. Гуров А. В. — интерпретация результатов, написание и редактирование

Литература/References

1. Крюков А.И., Гуров А.В., Юшкина М.А., Изотова Г.Н. Особенности клинического течения воспалительных заболеваний ротоглотки различной этиологии и возможности местной терапии. Вестник оториноларингологии. 2019; 84 (5): 68–72. <https://doi.org/10.17116/otorino20198405168>. [Kryukov A.I., Gurov A.V., Yushkina M.A., Izotova G.N. Peculiarities of clinical course of inflammatory diseases of the oropharynx of various etiologies and possibilities of local therapy. Vestnik Otorinolaringologii. 2019; 84 (5): 68–72 <https://doi.org/10.17116/otorino20198405168>. (in Russian).]
2. Гуров А. В., Мужичкова А.В., Юшкина М.А. Комплексный подход к лечению воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей. Лечебное дело. 2021; 3: 23–29. <https://doi.org/10.24412/2071-5315-2021-12356>. [Gurov A. V., Muzhichkova A.V., YUshkina M.A. Kompleksnyj podhod k lecheniyu vospalitel'nyh zaboolevanij verhnih dyhatel'nyh putej. Lechebnoe Delo. 2021; 3: 23–29. <https://doi.org/10.24412/2071-5315-2021-12356>. (in Russian)]
3. Сидоренко С.В., Дронов И.А. Место амоксициллина в лечении острых инфекций дыхательных путей у детей: диалог микробиолога и клинического фармаколога. Рос вестн перинатол и педиатр. 2020; 65 (3): 169–176. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2020-65-3-169-176>. [Sidorenko S.V., Dronov I.A. Amoxicillin in the treatment of acute respiratory infections in children: a dialogue between a microbiologist and a clinical pharmacologist. Ros Vestn Perinatol i Pediatr. 2020; 65 (3): 169–176. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2020-65-3-169-176>. (in Russian)]
4. Устойчивость к антибиотикам. Информационный бюллетень ВОЗ. 5 февраля 2018 г. (Электронный ресурс). URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (дата обращения: 13.08.2022). [Resistance to antibiotics. WHO Newsletter. February 5, 2018. Available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (Accessed date: 13.08.2022) (in Russian)]
5. Сидоренко С. В. Антимикробная резистентность: механизмы и пути преодоления. Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии: сборник тезисов докладов шестой междисциплинарной конференции, Нижний Новгород, 27–30 сентября 2020 года / Под редакцией К.В. Кудрявцева и Е.М. Паниной. М.: Издательство Перо, 2020; 95. [Sidorenko S. V. Antimikrobnaya rezistentnost': mekhanizmy i puti preodoleniya. Molekulyarnye i biologicheskie aspekty himii, farmacevtiki i farmakologii: sbornik tezisov dokladov shestoj mezhdisciplinarnoj konferencii, Nizhnij Novgorod, 27–30 sentyabrya 2020 goda. / Eds: K.V. Kudryavceva i E.M. Paninoy. Moscow: Izdatel'stvo Pero, 2020; 95. (in Russian)]
6. Bin Hafeez A., Jiang X., Bergen P.J., Zhu Y. Antimicrobial peptides: an update on classifications and databases. Int J Mol Sci. 2021 Oct 28; 22 (21): 11691. doi: 10.3390/ijms222111691.
7. Prenner E.J., Lewis R.N., McElhaney R.N. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 15; 1462 (1–2): 201–21. doi: 10.1016/S0005-2736(99)00207-2.
8. Rodríguez A.A., Otero-González A., Ghattas M., Ständker L. Discovery, optimization, and clinical application of natural antimicrobial peptides. Biomedicines. 2021 Oct 3; 9 (10): 1381. doi: 10.3390/biomedicines9101381.
9. Ghoreishi F.S., Roghanian R., Emtiazi G. Novel chronic wound healing by anti-biofilm peptides and protease. Adv Pharm Bull. 2022 May; 12 (3): 424–436. doi: 10.34172/apb.2022.047.
10. Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J.A., Siersma T., Aisenbrey C.H.M., Zaitseva E., Laubscher W.E., van Rensburg W., Behrendts J.C., Bechinger B., Hamoen L.W. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. mBio. 2018 Oct 9; 9 (5): e00802–18. doi: 10.1128/mBio.00802-18.
11. Berditsch M., Lux H., Babii O., Afonin S., Ulrich A.S. Therapeutic potential of gramicidin S in the treatment of root canal infections. Pharmaceuticals (Basel). 2016 Sep 7; 9 (3): 56. doi: 10.3390/ph9030056
12. Hale S.J.M., Wagner Mackenzie B., Lux C.A., Biswas K., Kim R., Douglas R.G. Topical antibiofilm agents with potential utility in the treatment of chronic rhinosinusitis: a narrative review. Front Pharmacol. 2022 Jun 13; 13: 840323. doi: 10.3389/fphar.2022.840323.
13. ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни. Доступ: <http://docs.cntd.ru/document/1200083430> (дата обращения: 03.08.2022 г.) [ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Klinicheskie laboratornye issledovaniya i diagnosticheskie test-sistemy *in vitro*. Issledovanie chuvstvitel'nosti infekcionnyh agentov i ocenka funktsional'nyh harakteristik izdelij dlya issledovaniya chuvstvitel'nosti k antimikrobnym sredstvam. CHast' 1. Referentnyj metod laboratornogo issledovaniya aktivnosti antimikrobnnyh agentov protiv bystrorastushchih aerobnyh bakterij, vyzyvayushchih infekcionnye bolezni. — Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200083430> (Accessed: 03.08.2022) (in Russian)]
14. Рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам Версия 2021-01». Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии — Доступ: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf> (дата обращения: 03.08.2022 г.) [Rekomendacii «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam Versiya 2021-01». Mezhhregional'naya associaciya po klinicheskoy mikrobiologii i antimikrobnoy himioterapii Available at: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf> (Accessed: 03.08.2022) (in Russian)].
15. Parvekar P, Palaskar J, Metgud S., Maria R., Dutta S. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. Biomater Investig Dent. 2020 Jul 23; 7 (1): 105–109. doi: 10.1080/26415275.2020.1796674.
16. Rodríguez-Melcón C., Alonso-Calleja C., García-Fernández C., Carballo J., Capita R. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials (Biocides

- and Antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology* (Basel). 2021 Dec 29; 11 (1): 46. doi: 10.3390/biology11010046.
17. Knapp L., Amézquita A., McClure P., Stewart S., Maillard J.Y. Development of a protocol for predicting bacterial resistance to microbicides. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Apr; 81 (8): 2652–2659. doi: 10.1128/AEM.03843-14.
 18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline. CLSI documents M26-A. ISBN 1-56238-384-1. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087, USA.
 19. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect*. 2000 Sep; 6 (9): 503–508. doi: 10.1046/j.1469-0691.2000.00149.x.
 20. Essack S., Bell J., Burgoyne D.S., Duerden M., Shephard A. Topical (local) antibiotics for respiratory infections with sore throat: an antibiotic stewardship perspective. *J Clin Pharm Ther*. 2019 Dec; 44 (6): 829–837. doi: 10.1111/jcpt.13012.
 21. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Mar; 11 (3): 297–308. doi: 10.1586/eri.13.12.
 22. Dubos R.J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: i. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. *J Exp Med*. 1939 Jun 30; 70 (1): 1–10. doi: 10.1084/jem.70.1.1.
 23. Gause G.F., Brazhnikova M.G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature*. 1944; 154: 703. doi: 10.1038/154703a0.
 24. Gause G.F., Brazhnikova M.G. Gramicidin S Origin and mode of action. *Lancet*. 1944; 244: 715–716.
 25. Betzel C., Rachev R., Dolashka P., Genov N. Actinomycins as proteinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Jan 15; 1161 (1): 47–51. doi: 10.1016/0167-4838(93)90194-v.
 26. Katsu T., Kobayashi H., Hirota T., Fujita Y., Sato K., Nagai U. Structure-activity relationship of gramicidin S analogues on membrane permeability. *Biochim Biophys Acta*. 1987 May 29; 899 (2): 159–170. doi: 10.1016/0005-2736(87)90396-8.
 27. Afonin S., Glaser R.W., Sachse C., Salgado J., Wadhvani P., Ulrich A.S. (19)F NMR screening of unrelated antimicrobial peptides shows that membrane interactions are largely governed by lipids. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep; 1838 (9): 2260–2268. doi: 10.1016/j.bbame.2014.03.017.
 28. Zhang L., Rozek A., Hancock R.E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21; 276 (38): 35714–35722. doi: 10.1074/jbc.M104925200.
 29. Hartmann M., Berditsch M., Hawecker J., Ardakani M.F., Gerthsen D., Ulrich A.S. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug; 54 (8): 3132–3142. doi: 10.1128/AAC.00124-10.
 30. Wenzel M., Kohl B., Münch D., Raatschen N., Albada H.B., Hamoen L., Metzler-Nolte N., Sahl H.G., Bandow J.E. Proteomic response of *Bacillus subtilis* to antibiotics reflects differences in interaction with the cytoplasmic membrane. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov; 56 (11): 5749–5757. doi: 10.1128/AAC.01380-12.
 31. Berditsch M., Afonin S., Reuster J., Lux H., Schkolnik K., Babii O., Radchenko D.S., Abdullah I., William N., Middel V., Strähle U., Nelson A., Valko K., Ulrich A.S. Supreme activity of gramicidin S against resistant, persistent and biofilm cells of staphylococci and enterococci. *Sci Rep*. 2019 Nov 29; 9 (1): 17938. doi: 10.1038/s41598-019-54212-z.
 32. Krauss E.M., Chan S.I. Complexation and phase transfer of nucleotides by gramicidin S. *Biochemistry*. 1983 Aug 30; 22 (18): 4280–4291. doi: 10.1021/bi00287a019.
 33. Krauss E.M., Chan S.I. Complexation and phase transfer of nucleic acids by gramicidin S. *Biochemistry*. 1984 Jan 3; 23 (1): 73–77. doi: 10.1021/bi00296a012.
 34. de la Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Haney E.F., Straus S.K., Hancock R.E. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog*. 2014 May 22; 10 (5): e1004152. doi: 10.1371/journal.ppat.1004152.
 35. Cortay J.C., Cozzone A.J. Accumulation of guanosine tetraphosphate induced by polymyxin and gramicidin in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Feb 22; 755 (3): 467–473. doi: 10.1016/0304-4165(83)90251-9.
 36. Kuppusamy R., Willcox M., Black D.S., Kumar N. Short Cationic Peptidomimetic Antimicrobials. *Antibiotics* (Basel). 2019 Apr 18; 8 (2): 44. doi: 10.3390/antibiotics802004460.
 37. Berditsch M., Afonin S., Vladimirova T., Wadhvani P., Ulrich A.S. Antimicrobial peptides can enhance the risk of persistent infections. *Front Immunol*. 2012 Aug 1; 3: 222. doi: 10.3389/fimmu.2012.00222.
 38. Yeung A.T., Gellatly S.L., Hancock R.E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol. Life Sci*. 2011; 68: 2161–2176. doi: 10.1007/s00018-011-0710-x.
 39. Yang Q., Li M., Spiller O.B., Andrey D.O., Hinchliffe P., Li H., MacLean C., Niumsups P., Powell L., Pritchard M., et al. Balancing mcr-1 expression and bacterial survival is a delicate equilibrium between essential cellular defence mechanisms. *Nat. Commun*. 2017; 8: 2054. doi: 10.1038/s41467-017-02149-0.
 40. Hu C., Wen Q., Huang S., Xie S., Fang Y., Jin Y., Campagne R., Alezra V., Miclet E., Zhu J., Wan Y. Gramicidin-S-Inspired cyclopeptidomimetics as potent membrane-active bactericidal agents with therapeutic potential. *ChemMedChem*. 2021 Jan 19; 16 (2): 368–376. doi: 10.1002/cmdc.202000568.
 41. Rathman B.M., Allen J.L., Shaw L.N., Del Valle J.R. Synthesis and biological evaluation of backbone-aminated analogues of gramicidin S. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020 Aug 1; 30 (15): 127283. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127283.
 42. Guan Q., Chen K., Chen Q., Hu J., Cheng K., Hu C., Zhu J., Jin Y., Miclet E., Alezra V., Wan Y. Development of Therapeutic Gramicidin S Analogues Bearing Plastic β,γ -Diamino Acids. *ChemMedChem*. 2020 Jun 17; 15 (12): 1089–1100. doi: 10.1002/cmdc.202000097.
 43. Yamamura H., Isshiki K., Fujita Y., Kato H., Katsu T., Masuda K., Osawa K., Miyagawa A. Gramicidin S-inspired antimicrobial cyclodextrin to disrupt gram-negative and gram-positive bacterial membranes. *Medchemcomm*. 2019 Jul 17; 10 (8): 1432–1437. doi: 10.1039/c9md00229d.
 44. Guan Q., Huang S., Jin Y., Campagne R., Alezra V., Wan Y. Recent advances in the exploration of therapeutic analogues of gramicidin S, an old but still potent antimicrobial peptide. *J Med Chem*. 2019 Sep 12; 62 (17): 7603–7617. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00156.
 45. Swierstra J., Kapoerchan V., Knijnenburg A., van Belkum A., Overhand M. Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 May; 35 (5): 763–769. doi: 10.1007/s10096-016-2595-y.
 46. Tamaki M., Takanashi K., Harada T., Fujinuma K., Shindo M., Kimura M., Uchida Y. Novel cycloundecapeptides related to gramicidin S with both high antibiotic activity and low hemolytic activity. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2011; 59 (12): 1481–1484. doi: 10.1248/cpb.59.1481.
 47. Derbal S., Hensler M., Fang W., Nizet V., Ghedira K., Nefzi A. On resin amino acid side chain attachment strategy for the head to tail synthesis of new glutamine containing gramicidin-S analogs and their antimicrobial activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Oct 1; 20 (19): 5701–5704. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.08.015.
 48. Solanas C., de la Torre B.G., Fernández-Reyes M., Santiveri C.M., Jiménez M.A., Rivas L., Jiménez A.L., Andreu D., Cativiela C. Therapeutic index of gramicidin S is strongly modulated by D-phenylalanine analogues at the beta-turn. *J Med Chem*. 2009 Feb 12; 52 (3): 664–674. doi: 10.1021/jm800886n.
 49. Jelokhani-Niaraki M., Hodges R.S., Meissner J.E., Hassenstein U.E., Wheaton L. Interaction of gramicidin S and its aromatic amino-acid analog with phospholipid membranes. *Biophys J*. 2008 Oct; 95 (7): 3306–3321. doi: 10.1529/biophysj.108.137471.
 50. Kawai M., Yamamura H., Tanaka R., Umemoto H., Ohmizo C., Higuchi S., Katsu T. Proline residue-modified polycationic analogs of gramicidin S with high antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and low hemolytic activity. *J Pept Res*. 2005 Jan; 65 (1): 98–104. doi: 10.1111/j.1399-3011.2004.00204.x.
 51. Kondejewski L.H., Farmer S.W., Wishart D.S., Kay C.M., Hancock R.E., Hodges R.S. Modulation of structure and antibacterial and hemolytic activity by ring size in cyclic gramicidin S analogs. *J Biol Chem*. 1996 Oct 11; 271 (41): 25261–25268. doi: 10.1074/jbc.271.41.25261.
 52. Soejima Y., Hashiguchi A., Izumiya N. Syntheses and antibacterial activities of gramicidin S analogs containing L-ornithine in place of L-valine. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1994 May; 58 (5): 826–829. doi: 10.1271/bbb.58.826.
 53. Ando S., Aoyagi H., Shinagawa S., Nishino N., Waki M., Kato T., Izumiya N. [4,4'-D-diaminopropionic acid]gramicidin S: a synthetic gramicidin S analog with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. *FEBS Lett*. 1983 Sep 5; 161 (1): 89–92. doi: 10.1016/0014-5793(83)80736-4.
 54. Yonezawa H., Kaneda M., Tominaga N., Higashi S., Izumiya N. Adsorption of ¹⁴C-labeled gramicidin S on cell of bacteria. *J Biochem*. 1981 Oct; 90 (4): 1087–1091. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133560.
 55. Derbal S., Hensler M., Fang W., Nizet V., Ghedira K., Nefzi A. On resin amino acid side chain attachment strategy for the head to tail synthesis of new glutamine containing gramicidin-S analogs and their antimicrobial activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Oct 1; 20 (19): 5701–5704. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.08.015.
 56. Габидова А.Э., Галынкин В.А. Основные начала возникновения резистентности в биосфере. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017; 3–1: 92–102. Доступ: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11407> (дата обращения: 16.08.2022) (Gabidova A.E., Galynkin V.A. Osnovnye nachala vozniknoveniya rezistentnosti v biosfere. Mezhdunarodnyj Zhurnal Prikladnyh i Fundamental'nyh Issledovaniy. 2017; 3–1: 92–102 Available at: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11407> (Accessed: 16.08.2022) (in Russian))

Информация об авторах

Гуров Александр Владимирович — д. м. н., профессор, кафедра оториноларингологии лечебного факультета, кафедра микробиологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова; Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л. И. Свержевского. Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9811-8397

Боровкова Кристина Евгеньевна — руководитель лаборатории микробиологии, АО «НПО «Дом фармации». Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0003-1571-6549

Крышень Кирилл Леонидович — к. б. н., руководитель отдела токсикологии и микробиологии, АО «НПО «Дом фармации». Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0003-1451-7716; eLibrary SPIN: 5650-2840

Никифорова Лия Ринатовна — научный сотрудник лаборатории микробиологии, АО «НПО «Дом фармации». Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0001-8710-2023

Салмова Юлия Владимировна — научный сотрудник лаборатории микробиологии, АО «НПО «Дом фармации». Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0001-9891-8634

About the authors

Alexander V. Gurov — D. Sc. in medicine, Professor, Pirogov Russian National Research Medical University; Sverzhovsky Scientific and Research Otolaryngology Clinical Institute, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9811-8397

Kristina E. Borovkova — Head of the Laboratory of Microbiology, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0003-1571-6549

Kirill L. Kryshen — Ph. D. in biology, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0003-1451-7716. eLibrary SPIN: 5650-2840

Lia R. Nikiforova — Researcher at the Laboratory of Microbiology, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0001-8710-2023

Julia V. Salmova — Researcher at the Laboratory of Microbiology, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0001-9891-8634

Исследование антивирусной активности адамантансодержащих химических соединений

И. И. ЛЮБИМОВ¹, *Е. И. ИСАЕВА², Е. Н. ВЕТРОВА², А. В. ЛАВРОВА¹,
Н. М. ГРЕЦКАЯ³, И. В. СЕРКОВ⁴, В. В. БЕЗУГЛОВ³, Г. А. ГАЛЕГОВ²

¹ ООО Gurus BioPharm, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН», Москва, Россия

⁴ ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН», Черноголовка, Московская обл., Россия

Study of the Antiviral Activity of Adamantane-Containing Chemical Compounds

IGOR I. LYUBIMOV¹, *ELENA I. ISAEVA², ELIZAVETA N. VETROVA²,
ALINA V. LAVROVA¹, NATALIA M. GRETSKAYA³, IGOR V. SERKOV⁴,
VLADIMIR V. BEZUGLOV³, GEORGY A. GALEGOV²

¹ Gurus BioPharm, Moscow, Russia

² National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya, Moscow, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS, Moscow, Russia

⁴ Institute of Physiologically Active Compounds of the RAS, Chernogolovka, Moscow region, Russia

Резюме

Гриппозная и коронавирусная инфекции являются особо опасными, вызывая пандемии и клинические осложнения со стороны нервной и сердечно-сосудистой систем и обострение хронических заболеваний (сахарный диабет, сердечная недостаточность, хронические обструктивные бронхопневмонии и т. п.), что может стать причиной отсроченной смерти, особенно у детей до двух лет, пожилых людей и лиц с ослабленным здоровьем. Цель настоящего исследования — поиск соединений эффективных в отношении этих двух актуальных вирусов, обладающих постоянной эпидемической активностью — вируса гриппа и бетакоронавируса среди новых производных адамантана, содержащих NO-донорный фрагмент или остаток дофамина. Определение цитотоксичности и противовирусной активности соединений на клеточных линиях, перmissive для вируса гриппа и бетакоронавируса. Изучена противовирусная активность 6 производных адамантана в отношении штаммов вируса гриппа (H1N1) и бетакоронавируса. Установлено, что NO-донорное производное сукцината аминоксидантанана и дофаминовое производное адамантанбензойной кислоты обладали наибольшей способностью подавлять развитие вируса гриппа с химиотерапевтическим индексом выше 60. Перспективных соединений в отношении бетакоронавируса выявлено не было.

Ключевые слова: вирус гриппа; бетакоронавирус; производные адамантана; противовирусная активность

Для цитирования: Любимов И. И., Исаева Е. И., Ветрова Е. Н., Лаврова А. В., Грецкая Н. М., Серков И. В., Безуглов В. В., Галегов Г. А. Исследование антивирусной активности адамантансодержащих химических соединений. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 7–8: 19–23. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-19-23>.

Abstract

Influenza and coronavirus infections are especially dangerous due to being capable of causing pandemics and clinical complications in the nervous and cardiovascular systems, as well as exacerbation of chronic diseases (diabetes mellitus, heart failure, chronic obstructive bronchopneumonia, etc.), which can cause delayed death, especially in children under two years of age, the elderly, and individuals with poor health. The aim of the study was to search for compounds effective against these two topical viruses which possess constant epidemic activity — influenza virus and betacoronavirus — among new adamantane derivatives containing a NO-donor fragment or a dopamine residue. Another purpose of the study was determination of cytotoxicity and antiviral activity of compounds on cell lines permissive for influenza virus and betacoronavirus. The antiviral activity of 6 adamantane derivatives against strains of the influenza virus (H1N1) and betacoronavirus was studied. It was established that the NO-donor derivative of aminoadamantane succinate and the dopamine derivative of adamantanebenzoic acid had the greatest ability to suppress the development of the influenza virus with a chemotherapeutic index above 60. No promising compounds against betacoronavirus were identified.

Keywords: influenza virus; betacoronavirus; adamantane derivatives; antiviral activity

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: ул. Гамалеи, д. 18, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, г. Москва, Россия, 123098.
E-mail: immunol.lab@mail.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 18 Gamalei st., National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya, Moscow, 123098 Russian Federation. E-mail: immunol.lab@mail.ru

Введение

Респираторные вирусные заболевания, вызванные вирусами гриппа и коронавирусом, являются наиболее актуальными инфекциями в настоящее время, вызывая тяжёлую патологию нервной и сердечно-сосудистой систем. Периодически появляющиеся новые пандемические штаммы, к которым отсутствует популяционный иммунитет, превращают грипп и коронавирус в особо опасные инфекции [1–4].

Среди представителей семейства коронавирусов патогенными для человека являются два рода Alphacoronavirus (NL63, 229E) и Betacoronavirus (OC43, новое наименование — BetaCoV1 (2014), HKU1, SARS-CoV, MERS CoV). Основными клетками-мишенями для коронавирусов являются эпителиальные клетки дыхательных путей и макрофаги, имеющие на своей поверхности рецепторы, с которыми взаимодействует поверхностный S-белок вируса. Коронавирусы, индуцируя слияние клеток, оказывают сильное воздействие на проницаемость мембран клеток, что приводит к нарушению водно-солевого баланса и транспорта белков. Также, обладая способностью к индукции апоптоза, данные возбудители вызывают некроз поражённых тканей, обуславливая образование у пациентов после выздоровления фиброзных рубцов в лёгких. Пандемический потенциал бетакоронавируса проявился в 2019 г., поскольку в человеческой популяции полностью отсутствовал иммунитет к появившемуся варианту [5].

Вирусы гриппа типа А подразделяются на подтипы на основе различных комбинаций восемнадцати вариантов гемагглютиниона и одиннадцати вариантов нейраминидазы. Три подтипа А (H1N1), А (H2N2) и А (H3N2) циркулируют в человеческой популяции. Эти вирусы вместе с вирусами гриппа В являются этиологическими факторами ежегодных эпидемий различной степени тяжести. Регулярно появляются штаммы гриппа с «новыми» антигенными свойствами. Если изменение является достаточным, чтобы преодолеть уже существующий иммунитет у населения, вирус способен вызывать эпидемии.

Перечисленные особенности определяют трудности создания эффективных противовирусных препаратов. Известно два класса препаратов, ингибирующих М2 белок или активность вирусной нейраминидазы (NA) вирусов гриппа. Ингибиторы первого класса — производные адмантана (амантадин и римантадин) — действуют против гриппа А (но не В). Препараты, ингибирующие NA — занамивир и тамифлу (Осельта-

мивир). К бетакоронавирусу широкий поиск эффективных соединений только начинается, находясь в развитии.

Формирование лекарственной устойчивости вирусов к препаратам, которое имело место в случае с амантадином и римантадином, также диктует необходимость получения аналогов используемых в медицинской практике лекарственных средств.

Цель исследования — поиск соединений эффективных в отношении этих двух актуальных вирусов, обладающих постоянной эпидемической активностью — вируса гриппа и бетакоронавируса среди новых производных адмантана, содержащих NO-донорный фрагмент или остаток дофамина.

Материал и методы

Исходные аминокислоты, адмантан, адмантанкарбоновая и адмантанбензойная кислоты предоставлены д. х. н. И. В. Серковым, (ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка).

В работе использованы химические соединения NMG1120; Lav060; NMG1118; NMG1107; NMG 1110; IVS-a01 с исходной концентрацией 20 мМ. Соединения Lav060, NMG1107, NMG 1110 и IVS-a01 являются производными адмантана, NMG1120, NMG1118 — производные мемантина (рис. 1).

Соединения LAV060, NMG 1107, NMG 1110, NMG 1118, NMG 1120 были синтезированы в лаборатории оксипиринов ИБХ РАН, после хроматографической очистки их чистота составляла не менее 97%, для экспериментов были приготовлены 20 мМ растворы веществ в DMSO.

Культуры клеток. МДСК — эпителиальные клетки почки шпангеля, перmissive для вируса гриппа. Линия клеток Vero — эпителиальные клетки почки африканской зелёной обезьяны (*Chlorocebus aethiops*), перmissive для бетакоронавируса. Культуры клеток получены из Государственной коллекции клеточных культур Института вирусологии им. Д. И. Ивановского Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава РФ. Культуры клеток МДСК выращивали с использованием ростовой среды Игла MEM и культуру клеток Vero — с использованием ростовой среды DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиками.

Вирус. В работе использовали вирус гриппа А/California/04/09 (H1N1), адаптированный к размножению на клеточной линии МДСК и авторский штамм коронавируса HCoV-R ГКВ № 2431 (Государственная коллекция вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» п/р НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздрава России). Вирусосодержащий материал представлял собой культуральную жидкость, собранную из заражённых клеток. Инфекционный титр вируса гриппа А/California/04/09 (H1N1) 6,0 lg ТЦИД₅₀, бетакоронавируса — 4,0 lg ТЦИД₅₀. В работе использовали 3-дневный монослой перевиваемой клеточной линии, выращенный на соответствующей среде с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), L-глутамин и антибиотиков — 150 ед/мл пенициллина и 150 ед/мл стрептомицина [6].

Цитотоксичность соединений для клеточных линий. Токсичность исследуемых химических соединений оценивали по снижению жизнеспособности клеток МДСК и Vero в МТТ-тесте [7]. Монослой клеток культивировали в присутствии исследуемых субстанций в концентрациях в течение 72 ч при

04/09 (H1N1), в культуре клеток МДСК приведены в табл. 1. Соединения Lav060 и NMG1110 проявляют высокую противовирусную активность при концентрации 0,157 мМ и ХТИ 63,7.

Соединения NMG1120 и NMG1107 способны ингибировать развитие вирусосодержащего ЦПД, индуцированное вирусом гриппа с более низким эффектом. ХТИ в этом случае составил 2,0 при невысокой концентрации соединений.

Результаты исследования репродукции вируса гриппа под влиянием соединений представлены на рис. 2, из которого видно, что наиболее активно снижают инфекционный титр вируса соединения Lav060 в концентрации 0,157 мМ на $2,5 \lg \pm 0,38$ и соединение NMG 1110 на $2,0 \lg \pm 0,52$ ТЦИД₅₀. При этом производные адамантана IVS-a01 и NMG1118 — не проявили значимой противовирусной активности на данном штамме вируса гриппа.

При изучении активности соединений в отношении сезонного бетакоронавируса при заражении клеток с множественностью инфицирования 0,1ТЦИД₅₀ противовирусная активность установлена у двух препаратов Lav060 и NMG1118 с низкой эффективностью с ХТИ только 2,0 (табл. 2).

Исследуемые соединения NMG1120; NMG1107; NMG 1110; IVS-a01 не обладали способностью снижать инфекционный титр бетакоронавируса в культуре клеток Vero в диапазоне изучаемых концентраций.

Таким образом, были исследованы 6 новых производных адамантана в отношении актуальных вирусов гриппа и сезонного бетакоронавируса, которые обладают постоянной эпидемиологической активностью. Установлено, что субстанции Lav060 и NMG1118 проявляют высокую противогриппозную активность при концентрации 0,157 мМ и ХТИ 63,7. В отношении бетакоронавируса противовирусная активность указанных веществ проявлялась с низкой эффективностью (ХТИ = 2,0) соединения. Lav060 и NMG1118 слабо снижали репродукцию бетакоронавируса в культуре клеток Vero. Соединения NMG1120, NMG1107 и IVS-a01 способны ингибировать развитие ЦПД, индуцированное вирусом гриппа, с более низким эффектом. ХТИ в этом случае составил 2,0 при максимальной концентрации соединений.

Таблица 1. Противовирусная активность соединений на модели гриппа A/California/04/09 (H1N1) в культуре клеток МДСК

Table 1. Antiviral activity of the compounds in the influenza A/California /04/09 (H1N1) model in MDCK cell culture.

Химическое соединение	ЦД ₅₀ , мМ	СС ₅₀ , мМ	ХТИ
NMG1120	5	2,5	2
Lav060	10	0,157	63,7
NMG1107	10	5	2
NMG 1110	10	0,157	63,7

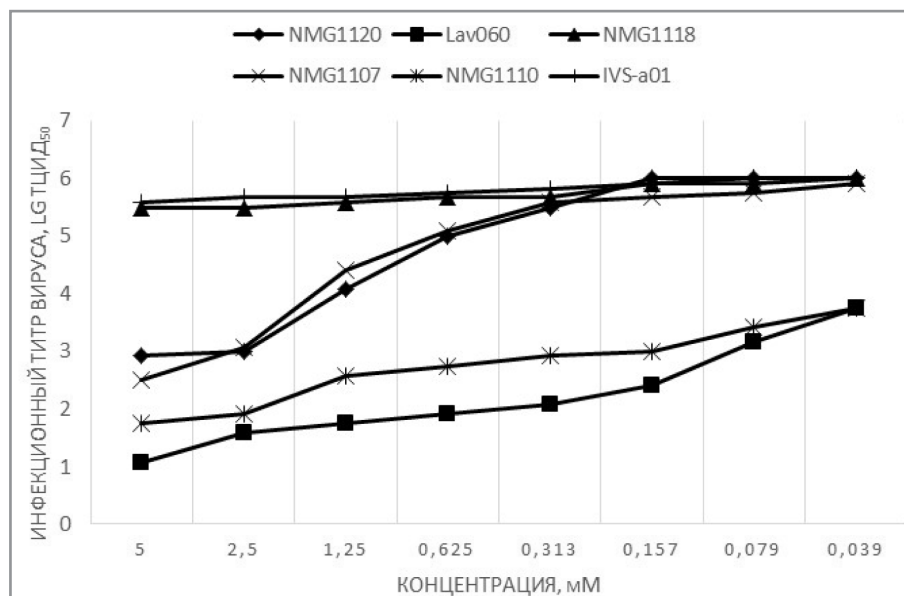


Рис. 2. Инфекционный титр вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1) в культуре клеток МДСК под действием препаратов.

Fig. 2. Infectious titer of influenza virus A/California /04/09 (H1N1) in MDCK cell culture after being exposed to the medication.

Таблица 2. Исследование соединений на модели бетакоронавируса в культуре клеток Vero

Table 2. Study of compounds in the betacoronavirus model in the Vero cell culture.

Препарат	ЦД ₅₀ , мМ	СС ₅₀ , мМ	ХТИ
Lav060	1,25	0,625	2
NMG1118	0,313	0,157	2

КЛЮЧЕНИЕ

Среди группы производных адамантана были выявлены два соединения, представляющие собой NO-донорное производное сукцината аминокислоты адамантана (Lav060) и дофаминовое производное адамантанбензойной кислоты (NMG1110), обладающие способностью ингибировать инфекционную активность штамма вируса гриппа H1N1 с высоким химиотерапевтическим эффектом. В отношении бетакоронавируса все исследованные соединения проявили очень низкую активность.

Дальнейшие исследования этих новых веществ позволят более детально определить механизм их активности и наметить пути дальнейшей модификации структуры с целью повышения противовирусной активности.

Литература/References

1. Clementi N., Ghosh S., De Santis M., Castelli M., Criscuolo E., Zannoni I. et al. Viral Respiratory Pathogens and Lung Injury. Clin Microbiol Rev. 2021; 34 (3): e00103–20. Published 2021 Mar 31. doi: 10.1128/CMR.00103-20.
2. Lafond K.E., Porter R.M., Whaley M.J., Suizan Z., Ran Z., Aleem M.A. et al. Global burden of influenza-associated lower respiratory tract infections and hospitalizations among adults: A systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2021; 18 (3): e1003550. Published 2021 Mar 1. doi: 10.1371/journal.pmed.1003550.
3. Rath B., Conrad T., Myles P., Alchikh M., Ma X., Hoppe C. et al. Influenza and other respiratory viruses: standardizing disease severity in surveillance and clinical trials. Expert Rev Anti Infect Ther. 2017; 15 (6): 545–568. doi:10.1080/14787210.2017.1295847.
4. Al-Romaihi H.E., Smatti M.K., Al-Khatib H.A., Coyle P.V., Ganesan N., Na-deem S. et al. Molecular epidemiology of influenza, RSV, and other respiratory infections among children in Qatar: A six years report (2012–2017). Int J Infect Dis. 2020; 95: 133–141. doi: 10.1016/j.ijid.2020.04.008.
5. Flerlage T., Boyd D.F., Meliopoulos V., Thomas P.G., Schultz-Cherry S. Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract. Nat Rev Microbiol. 2021; 19 (7): 425–441. doi: 10.1038/s41579-021-00542-7.
6. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol Meth. 1983; 65: 55–56. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
7. Sawamura R., Sun Y., Yasukawa K., Shimizu T., Watanabe W., Kurokawa M. Antiviral activities of diarylheptanoids against influenza virus *in vitro*. J Nat Med. 2010 Jan; 64 (1): 117–20. doi: 10.1007/s11418-009-0372-2.
8. Einfeld A.J., Neumann G., Kawaoka Y. Influenza A virus isolation, culture and identification. Nat Protoc. 2014 Nov; 9 (11): 2663–2681. doi: 10.1038/nprot.2014.180.
9. Ребров О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва. «МедиаСфера». 2000; 312. [Rebrov O. Yu. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA. Moskva. «MediaSfera». 2000; 312. (in Russian)]
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией Р. У. Хабриева. 2-е изд., М.: «Медицина». 2012; 832. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novyh farmakologicheskikh veshchestv / Ed. R. U. Habrieva. 2-e izd., Moscow, Medicina. 2012; 832. (in Russian)]

Информация об авторах

Любимов Игорь Иванович — генеральный директор, Gurus BioPharm, Москва, Россия

Исаева Елена Ивановна — к. б. н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-2523-0692. eLIBRARY SPIN-код: 85833

Ветрова Елизавета Николаевна — научный сотрудник, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-1902-5278. eLIBRARY SPIN-код: 1036027

Лаврова Алина Викторовна — научный сотрудник, Gurus BioPharm, Москва, Россия

Грецкая Наталья Михайловна — к. х. н., старший научный сотрудник, ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-1332-9396. eLIBRARY SPIN-код: 94106

Серков Игорь Викторович — д. х. н., ведущий научный сотрудник, ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН», Черноголовка, Московская обл. ORCID: 0000-0001-5265-0329. eLIBRARY SPIN-код: 45228

Безуглов Владимир Виленович — д. х. н., главный научный сотрудник, профессор, ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-8439-8607. eLIBRARY SPIN-код: 45227

Галегов Георгий Артемьевич — д. м. н., профессор, руководитель лаборатории, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-6162-1650. eLIBRARY SPIN-код: 79135

About the authors

Igor I. Lyubimov — General Director, Gurus BioPharm, Moscow, Russia

Elena I. Isaeva — Ph. D. in biology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russia, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2523-0692. eLIBRARY SPIN: 85833

Elizaveta N. Vetrova — Researcher, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russia, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-1902-5278. eLIBRARY SPIN: 1036027

Alina V. Lavrova — Researcher, Gurus BioPharm, Moscow, Russia

Natalia M. Gretskeya — Ph. D. in chemistry, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-1332-9396. eLIBRARY SPIN: 94106

Igor V. Serkov — D. Sc. in chemistry, Institute of Physiologically Active Compounds of the RAS, Chernogolovka, Moscow region, Russia. ORCID: 0000-0001-5265-0329. eLIBRARY SPIN: 45228

Vladimir V. Bezuglov — D. Sc. in chemistry, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-8439-8607. eLIBRARY SPIN: 45227

Georgy A. Galegov — D. Sc. in medicine, Professor, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-6162-1650. eLIBRARY SPIN: 79135

Оценка токсикологического профиля новой лекарственной формы препарата Диоксидин (раствор для местного и наружного применения, 0,025%)

*М. В. ЖУРАВЛЁВА¹, Е. А. РОЩИНА², Е. А. ЛОСЕВА², А. В. ГУРОВ^{3,4}

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² АО «НПО «Дом Фармации», г. п. Кузьмолловский, Ленинградская обл., Россия

³ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л. И. Свержевского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Assessment of The Toxicological Profile of The New Dioxidine Dosage Form (Solution for Topical and External Use, 0.025%)

*MARINA V. ZHURAVLEVA¹, ELIZABETH A. ROSHCHINA², CATHERINE A. LOSEVA², ALEXANDER V. GUROV^{3,4}

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

² JSC RMC «Home of Pharmacy», Kuzmolovskiy urban-type settlement, Leningrad region, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ Sverzhovsky Research Clinical Institute of Otorhinolaryngology, Moscow, Russia

Резюме

Изучали общую токсичность с оценкой местной переносимости, иммуотоксичности и фармакологической безопасности новой лекарственной формы препарата Диоксидин, раствор для местного и наружного применения, 0,25 мг/мл (0,025%) для лечения острого тонзиллофарингита (АО «Валента Фарм», Россия). В эксперимент брали 48 кроликов (в равной пропорции по полу), рандомизированных в 3 группы ($n=16$ в каждой группе), и которым в течение 28 дней орошали заднюю стенку глотки исследуемыми веществами. Группа 1 — контрольная (водный раствор NaCl 0,9% для инфузий в суточной дозе 4,0 мл/животное); группа 2 — диоксидин (1,8 мл/животное); группа 3 — диоксидин (4,0 мл/животное). Животных наблюдали весь период введения препаратов — до 28 дня эксперимента, и в период отсроченного наблюдения — до 58 дня. Регистрировали показатели: летальность, ежедневное наблюдение общего состояния и поведения, взвешивание, учёт потребления корма и воды, частоту дыхательных движений, ЧСС, АД, коэффициенты массы внутренних органов, выполняли электрокардиограмму. Проводили оценку иммуотоксичности, симптоматики отравления, надпочечниковой недостаточности и результатов вскрытия животных. Выполняли клинический и биохимический анализы крови, анализ свёртывающей системы крови, анализ мочи, макроскопическое и гистологическое исследования внутренних органов. Отсутствие статистически значимых различий всех оцениваемых показателей между группой животных, получавших диоксидин раствор для местного и наружного применения, 0,25 мг/мл (0,025%) в дозе 1,8 мл/животное (эквивалент 15 терапевтических доз для человека), группой, получавших диоксидин в дозе 4,0 мл/животное (эквивалент 35 терапевтических доз для человека) и контрольной группой, позволили сделать выводы об отсутствии признаков общей токсичности, включая токсическое влияние на надпочечники, кардиотоксичности, иммуотоксичности и токсического влияния на другие органы и системы органов, а также местного раздражающего и токсического действия при многократном распылении диоксида на заднюю стенку глотки кроликов на протяжении 28 дней и в период отсроченного наблюдения.

Ключевые слова: общая токсичность; местное раздражающее действие; надпочечниковая недостаточность; диоксидин; фармакологическая безопасность

Для цитирования: Журавлёва М. В., Рощина Е. А., Лосева Е. А., Гуров А. В. Оценка токсикологического профиля новой лекарственной формы препарата диоксидин (раствор для местного и наружного применения, 0,025%). *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 7–8: 24–32. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-24-32>.

Abstract

The general toxicity was studied with an assessment of local tolerability, immunotoxicity, and pharmacological safety of the new medicine Dioxidine®, a solution for topical and external use, 0.25 mg/ml (0.025%) for the treatment of acute tonsillopharyngitis (JSC «Valenta Pharm», Russia). The experiment included 48 rabbits (divided in equal proportion by sex) randomized into 3 groups ($n=16$ in each group), whose back wall of the pharynx was irrigated with the studied substances

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: ул. Трубецкая, д. 2, стр. 4, ПМГМУ им. И. М. Сеченова, г. Москва, Россия, 119991.
E-mail: mvzhuravleva@mail.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 2 bld 4 Trubetskaya st., I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia.
E-mail: mvzhuravleva@mail.ru

for 28 days. Group 1 — control (aqueous solution of NaCl 0.9% for infusions at a daily dose of 4.0 ml/animal); group 2 — dioxidine (1.8 ml/animal); group 3 — dioxidine (4.0 ml/animal). The animals were observed for the entire period of drug administration — up to the 28th day of the experiment, as well as during the delayed observation period — up to the 58th day. The following indicators were recorded: lethality, daily monitoring of general condition and behavior, weight, feed and water consumption, respiratory rate, heart rate, blood pressure, electrocardiogram, mass coefficients of internal organs. Immunotoxicity, poisoning symptoms, adrenal insufficiency, as well as animal autopsy results were assessed. Clinical and biochemical blood tests, blood coagulation system analysis, urine analysis, macroscopic and histological examination of internal organs were performed. The absence of statistically significant differences in all evaluated indicators between the group of animals receiving dioxidine solution for topical and external use, 0.25 mg/ml (0.025%) at a dose of 1.8 ml/animal (equivalent to 15 therapeutic doses for humans), the group receiving dioxidine at a dose of 4.0 ml/animal (equivalent to 35 therapeutic doses for humans) and the control group allowed us to draw conclusions concerning the absence of signs of general toxicity, including toxic effects on the adrenal glands, cardiotoxicity, immunotoxicity, and toxic effects on other organs and organ systems, as well as local irritant and toxic effects after repeated irrigation of dioxidine on the back wall of the pharynx in rabbits for 28 days and during the period of delayed observation.

Keywords: general toxicity; local irritant effect; adrenal insufficiency; dioxidine; pharmacological safety

For citation: Zhuravleva M. V., Roshchina E. A., Loseva E. A., Gurov A. V. Assessment of the toxicological profile of the new dioxidine dosage form (solution for topical and external use, 0.025%). *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 7–8: 24–32. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-24-32>.

Актуальность

Гидроксиметилхиноксалиндиоксид (Диоксидин) относится к группе синтетических противомикробных препаратов широкого спектра действия. С 1976 г. препарат зарегистрирован и разрешён к применению для медицинских целей в форме раствора для инъекций 1% [1]. Позднее диоксидин получил новые способы применения (наружный и местный) и до настоящего времени широко применяется в хирургии и оториноларингологии [2–6]. В числе показаний к применению препарата Диоксидин (раствор 1%) указано лечение острого тонзиллофарингита и обострения хронического тонзиллита (компенсированной формы) [7]. В рамках усовершенствования лекарственного обеспечения населения отечественными лекарственными препаратами [8] компанией-производителем (АО «Валента Фарм») была разработана новая лекарственная форма препарата для лечения острого тонзиллофарингита Диоксидин® — раствор для местного применения 0,25 мг/мл (0,025%). В период июня–декабря 2021 г. была проведена серия исследований по оценке токсикологического профиля данного препарата в соответствии с действующими требованиями [9]. Объём клинических испытаний определялся действующими нормативными документами [9–14]. Работы по изучению токсичности были выполнены в АО «НПО «Дом фармации» (Ленинградская область), по заказу фармацевтической компании АО «Валента Фарм».

Цель исследования — изучение общей токсичности с оценкой местной переносимости, иммунотоксичности и фармакологической безопасности препарата Диоксидин, раствор для местного и наружного применения, 0,25 мг/мл (0,025%) на кроликах при многократном распылении на заднюю поверхность глотки в течение 28 дней с пе-

риодом отсроченного наблюдения (АО «Валента Фарм», Россия).

Материал и методы

В качестве тест-системы были выбраны самцы и самки кроликов, ввиду их широкого успешного применения в токсикологических экспериментах [10], а также с учётом удобства нанесения исследуемых препаратов на заднюю стенку глотки у данного вида экспериментальных животных.

В эксперимент были взяты 48 кроликов породы «Белый великан» (самцы и самки в пропорции 1:1) в возрасте 14–16 нед. (масса тела самцов — 3120–4475 г и самок — 2910–4190 г), которых с помощью метода модифицированной блочной рандомизации распределили в 3 группы. В качестве тестируемого препарата применялся Диоксидин, раствор для местного и наружного применения, 0,25 мг/мл (АО «Валента Фарм», Россия), в качестве контрольного вещества — водный раствор NaCl 0,9% для инфузий (ООО «Гематек», Россия).

Исследуемые препараты распыляли на заднюю стенку глотки, в соответствии со способом введения препарата в клинической практике [10]. Дозы (мл/животное) тестируемого препарата были определены, исходя из расчёта суточной терапевтической дозы для человека. В соответствии с инструкцией по медицинскому применению (ИМП), тестируемый препарат планируется применять путём орошения задней стенки горла (3–4 кратное распыление) 3 раза в сутки. Принимая, что максимальный однократный объём распыления составляет 200 мкл, была рассчитана суточная терапевтическая доза (ТД) для человека — 1,8 мл раствора (200 мкл × 3 × 3) или 0,03 мл/кг для человека массой тела 60 кг. В эксперименте тестируемый препарат был изучен в следующих дозах: 1,8 мл/кролика (0,47 мл/кг для самца кролика массой 3,7 кг и 0,51 мл/кг для самки массой 3,5 кг) — группа 2, и 4,0 мл/кролика (1,05 мл/кг для самца и 1,14 мл/кг — для самки) — группа 3. Животным контрольной группы (группа 1) распыление контрольного вещества на заднюю стенку глотки осуществляли в объёме, эквивалентном максимальному объёму введения тестируемого препарата (4,0 мл). Животным групп 1 и 3 исследуемые объёмы распыляли 5 раз в день по 4 нажатия, разовая доза — 800 мкл/животное. Животным группы 2 орошение проводили 3 раза в день по 3 нажатия, разовая доза — 600 мкл/животное. Интервал между введениями составил от 30 до 60 мин. Исследуемые препараты вводили с 1-го по 28-й день эксперимента, руководствуясь требованиями OECD к местным способам применения [15].

Таким образом, тестируемый препарат в эксперименте изучался в дозах, превышающих ТД для человека в 15,8–17,1 раз и 35,1–37,1 раз (1,8 мл/животное и 4,0 мл/животное, соответственно). Продолжительность курса введения препаратов в эксперименте превышала рекомендуемую в 4 раза (28 дней по сравнению с 7 днями в соответствии с ИМП). Продолжительность периода отсроченного наблюдения составила 28 дней после завершения введения препаратов. Эвтаназию проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Советом ЕС от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [16] путём передозировки смеси ветеринарных препаратов Золетил 100 («Virbac Sante Animale», Франция) + Ксилазин 2% («Interchemie werken «De Adelaar» B.V», Нидерланды) и Пропофол-Каби 20 мг/мл (Фрезениус Каби Дойчланд ГмбХ, Германия), затем удаляли жизненно важные (лёгкие, сердце, головной мозг, надпочечники) и другие органы, включая глотку, тимус и селезёнку: 50% животных в группах — на 29-й день, оставшихся — на 59-й день эксперимента.

В ходе данного эксперимента анализировали клиническую картину интоксикации, оценивали фармакологическую безопасность в отношении сердечно-сосудистой, дыхательной и центральной нервной систем, выявляли органы-мишени в отношении возможного токсического действия тестируемых объектов, изучали местную переносимость и определяли иммунотоксические проявления. Кроме того, анализировали обратимость токсических эффектов.

Ежедневное клиническое наблюдение за животными осуществляли с 1-го по 28-й день введения препаратов и продолжали до 58-го дня включительно. Регистрацию массы тела, оценку потребления корма и воды и расширенный клинический осмотр проводили с 1-го дня еженедельно. Выполняли осмотр животного с исследованием места введения и регистрировали поведение животного, состояние кожных покровов и видимых слизистых оболочек, включая носовую и ротовую полости, наблюдали за процессами дефекации и мочеиспускания. Регистрация частоты дыхательных движений (ЧДД) при помощи пьезокерамического датчика (AD Instruments, Австралия), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и электрокардиограммы (ЭКГ) на компьютерном электрокардиографе для ветеринарии «Полиспектр-8/Е» (ООО «Нейрософт», Россия), артериального давления (АД) при помощи ветеринарного монитора давления Zoomed BPM-2 (Zoomed, Россия) у животных проводили на 1-й и 26-й дни (у животных, подлежащих эвтаназии на 29-й день эксперимента) под наркозом (смесь ветеринарных препаратов Золетил 100 («Virbac Sante Animale», Франция) + Ксилазин 2% («Interchemie werken «De Adelaar» B.V», Нидерланды)); гематологический анализ образцов крови на гематологическом анализаторе Mythic 18 Vet («Orphee», Швейцария), активность свёртывающей системы крови (активированное частичное тромбопластиновое время — АЧТВ и протромбированное время — ПВ) на анализаторе показателей гемостаза (коагулометр 4-канальный АПГ4-02-П, ООО «ЭМКО», Россия) и биохимического анализа на анализаторе Random Access «А-25» («BioSystems», Испания) осуществляли на 28-й и 58-й дни, а исследование образцов мочи — на 27-й и 59-й дни. Первые заборы крови и мочи осуществляли у животных, подлежащих эвтаназии на 29-й день эксперимента. Патоморфологическое исследование всех экспериментальных животных включало в себя некропсию и макроскопическое исследование. Органы, извлечённые при некропии, подвергали взвешиванию и гистологическому исследованию.

В рамках изучения иммунотоксических свойств анализировали показатели общего количества лейкоцитов, содержания гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов, уровень глобулинов, массовые коэффициенты тимуса и селезёнки, данные гистологического анализа тимуса, селезёнки и подчелюстных лимфатических узлов.

В ходе оценки фармакологической безопасности тестируемого препарата в отношении сердечно-сосудистой и дыха-

тельной систем (ССС и ДС) использовали показатели ЧДД, ЧСС, АД и ЭКГ, а также результаты гистологического анализа трахеи, лёгких и бронхов, сердца и аорты. Влияние исследуемых препаратов на состояние центральной нервной системы (ЦНС) оценивали по изменениям в поведении животных и по результатам гистологического анализа головного и спинного мозга.

Для оценки местной переносимости исследуемых объектов визуально оценивали макроскопические изменения видимой слизистой оболочки ротовой полости и глотки при клиническом осмотре и во время некропии с последующей гистологической оценкой глотки.

Для всех данных была применена описательная статистика: данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Рассчитывались: среднее значение (M), стандартная ошибка среднего (SEM) — в случае нормального распределения, медиана (Me) и квартильный размах ($Q1$; $Q3$) — в случае не соответствия закону нормального распределения. Межгрупповые различия были проанализированы параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения: для оценки данных с признаками нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и дисперсионный анализ с повторными измерениями; для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, применяли критерий Краскела–Уоллиса. Последующее межгрупповое сравнение осуществляли с использованием сравнения рангов.

Различия были определены при $p < 0,05$ уровне значимости. Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение

Гибель животных на протяжении всего исследования в экспериментальных группах отсутствовала. На начало эксперимента масса тела животных не отличалась между экспериментальными группами больше, чем на 20%, отдельно для самцов и самок. Статистический анализ выявил прирост массы тела самцов в контрольной группе и группе, получавшей тестируемый препарат в дозе 4,0 мл/животное и у самок во всех группах — в период введения, по данным отсроченного наблюдения — во всех группах у самцов, что отражает нормальный физиологический процесс у экспериментальных животных. На протяжении всех периодов наблюдения оценка потребления корма и воды животными (самцами и самками по отдельности) из групп 2 и 3 (диоксидин в дозах 1,8 мл/животное и 4,0 мл/животное) не имела статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой.

При ежедневном клиническом наблюдении и еженедельном клиническом осмотре, не выявили животных в неудовлетворительном состоянии, испытывающих боль или находившихся в состоянии дистресса. При клиническом осмотре отклонений во внешнем виде и поведении экспериментальных животных в сравнении с животными, получавшими контрольное вещество, не выявлено.

Влияния тестируемого препарата в дозах 1,8 мл/животное и 4 мл/животное (15,8–17,1 ТД

человека и 35,1–37,1 ТД человека) на общее состояние экспериментальных животных при распылении на заднюю стенку глотки не зарегистрировано как в период введения, так и в период отсроченного наблюдения.

При оценке влияния тестируемых препаратов на показатели системы гемостаза статистический анализ не выявил значимых различий между экспериментальными группами животных (отдельно самцов и самок) по АЧТВ и ПВ по окончании обоих периодов наблюдения.

В ходе оценки влияния исследуемого препарата на гематологические показатели крови при распылении на заднюю стенку глотки не было выявлено статистически значимых отличий между экспериментальными группами по окончании периода введения препаратов. По окончании периода отсроченного наблюдения были выявлены статистически значимые отличия у самцов группы 2 (распыление Диоксидина в дозе 1,8 мл/животное) относительно контрольной группы: лейкоциты — $8,5 \pm 0,62 \cdot 10^9/\text{л}$ и $6,5 \pm 0,45 \cdot 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$), моноциты — $2,9 \pm 0,41\%$ и $1,7 \pm 0,14\%$ ($p < 0,05$), соответственно. Выявленные различия между экспериментальными группами являются клинически незначимыми, так как показатели соответствуют лабораторным нормам по данному виду животных: лейкоциты — $5,2\text{--}12,5 \cdot 10^9/\text{л}$, моноциты — $0\text{--}10\%$ [17] и не имеют дозозависимости. Среди самок кроликов было выявлено статистически значимое уменьшение содержания гемоглобина в группе 3 (4 мл/животное) по сравнению с группой 2 (1,8 мл/животное) по окончании периода отсроченного наблюдения. Выявленное изменение показателя между экспериментальными группами не имеет клинической значимости, так как статистически значимых отличий от контрольной группы не выявлено, и показатель соответствует лабораторным нормам для данного вида животных: гемоглобин — $100\text{--}174 \text{ г/л}$ [17].

По данным, полученным по окончании периода введения, диоксидин не оказал влияния на биохимические показатели крови самцов, а у самок было выявлено статистически значимое повышение уровня глюкозы в группах тестируемого препарата в отличие от контрольной группы ($7,2 \pm 0,09 \text{ ммоль/л}$, $7,4 \pm 0,09 \text{ ммоль/л}$, $6,7 \pm 0,12 \text{ ммоль/л}$ для экспериментальных групп 2, 3 и контрольной группы, соответственно, $p < 0,05$). Однако выявленное различие между группами является клинически незначимым, так как показатель соответствует лабораторным нормам по данному виду животных: глюкоза — $4,2\text{--}8,6 \text{ ммоль/л}$ [17]. Анализ данных, полученных по окончании периода отсроченного наблюдения у самцов кроликов выявил следующие статистически значимые изменения: уменьшение показателей АЛТ ($42,4 \pm 2,71 \text{ Ед/л}$) и мочевины ($4,3 \pm 0,24 \text{ ммоль/л}$) в группе 2 и уменьшение показателя глюкозы в группе 3 ($6,8 \pm 0,18 \text{ ммоль/л}$) относи-

тельно контрольной группы ($57,6 \pm 1,29 \text{ Ед/л}$, $5,8 \pm 0,10 \text{ ммоль/л}$, $8,0 \pm 0,26$ для АЛТ, мочевины и глюкозы, соответственно, $p < 0,05$). Кроме того, в группе 2 отмечалось уменьшение показателя креатинина по сравнению с группами 1 и 3 ($124,3 \pm 3,50$; $141,7 \pm 4,42$ и $142,0 \pm 4,29$, соответственно, $p < 0,05$). Выявленные различия между экспериментальными группами являются клинически незначимыми, так как показатели соответствуют лабораторным нормам по данному виду животных: АЛТ — $14\text{--}80 \text{ Ед/л}$, креатинин — $44,2\text{--}221,0 \text{ мкмоль/л}$, глюкоза — $4,2\text{--}8,6 \text{ ммоль/л}$ [17], мочевина — $3,5\text{--}10,7 \text{ ммоль/л}$ [18]. Анализ данных, полученных у самок по окончании периода отсроченного наблюдения, не выявил статистически значимых отличий.

Анализ данных по показателям pH и относительной плотности мочи, полученных по окончании периода распыления исследуемых препаратов на заднюю стенку глотки и отсроченного наблюдения у самцов и самок кроликов не выявил статистически значимых отличий между экспериментальными группами. В связи с тем, что выявленный в полученных образцах мочи самок билирубин (на уровне «+»), присутствовал у животных из всех экспериментальных групп, обнаруженное изменение не имело клинического значения.

Анализ показателей АД и ЧДД, полученных на 1-й и 26-й дни эксперимента, не выявил статистически значимых межгрупповых различий. Анализ данных ЭКГ 1-го дня эксперимента выявил статистически значимое отличие по показателю PQ в группах 2 и 3 по сравнению с контрольной группой ($74 \pm 1,7 \text{ мсек}$, $74 \pm 2,7 \text{ мсек}$ и $82 \pm 0,6 \text{ мсек}$, соответственно, $p < 0,05$) у самок. Так как отличия были выявлены до введения исследуемого препарата, то были расценены как клинически незначимые, обусловленные вариантом нормы у данного вида животных. По остальным показателям ЭКГ самцов и самок, полученным в 1-й и 26-й дни эксперимента не было выявлено статистически значимых различий между экспериментальными группами. Гистологический анализ препаратов стенки сердца и стенки аорты, а также препаратов трахеи, бронхов и лёгких экспериментальных животных, подвергавшихся многократному орошению исследуемыми препаратами задней стенки глотки, не выявил каких-либо признаков повреждения тканей и клеток. Таким образом, была доказана фармакологическая безопасность диоксидина по влиянию на ССС и ДС животных.

Фармакологическая безопасность тестируемых препаратов в отношении ЦНС была установлена по данным ежедневного клинического наблюдения за животными (отсутствие нарушений координации движений, поведения, реакций на раздражители) и по результатам гистологического исследования головного и спинного мозга

Массовые коэффициенты надпочечников кроликов на 29-й и 59-й дни эксперимента при пути введения препаратов на заднюю стенку глотки, $M \pm SEM$, $n=4$.

Mass ratios of the adrenal glands of rabbits on the 29th and the 59th days of the experiment, $M \pm SEM$, $n=4$

Животные	Группа, №	День эксперимента	
		28-й	58-й
Самцы	1 (контрольное вещество, 4 мл/животное)	0,007±0,0006	0,011±0,0013
	2 (диоксидин, 1,8 мл/животное, 15,8 ТД человека)	0,009±0,0014	0,009±0,0008
	3 (диоксидин, 4 мл/животное, 35,1 ТД человека)	0,011±0,0021	0,011±0,0016
Самки	1 (контрольное вещество, 4 мл/животное)	0,008±0,0010	0,011±0,0005
	2 (диоксидин, 1,8 мл/животное, 15,8 ТД человека)	0,007±0,0005	0,013±0,0023
	3 (диоксидин, 4 мл/животное, 35,1 ТД человека)	0,010±0,0015	0,011±0,0013

(отсутствие макроскопических и микроскопических патологических изменений во всех экспериментальных группах).

По данным патологоанатомического и гистологического исследований животных при плановой некропии, диоксидин при изучаемом способе введения лабораторным животным не оказал негативного воздействия на патоморфологическое строение внутренних органов экспериментальных животных. Результат анализа зарегистрированных данных массы органов, полученных по окончании периодов введения и отсроченного наблюдения, а также массовых коэффициентов оцениваемых органов свидетельствовал о фармакологической безопасности диоксида при многократном нанесении на слизистую оболочку глотки лабораторных животных. Существующие данные [7] о возможности развития острой надпочечниковой недостаточности при передозировке препарата при внутривенном пути введения, обусловили отдельную оценку состояния надпочечников экспериментальных животных (таблица).

Как видно из приведённых данных, по окончании периодов введения и отсроченного наблюдения признаки патологического влияния диоксида на состояние надпочечников отсутствовали.

Представленные данные подтверждают результаты исследования, проведённого в АО «НПО «Дом Фармации» в 2018 г. с целью оценки влияния диоксида (раствор для внутриполостного, местного и наружного применения, 10 мг/мл) на морфологическое и функциональное состояние надпочечников половозрелых крыс при многократном введении с оценкой отсроченного влияния (30 дней введения + 30 дней наблюдения). В этом исследовании было показано отсутствие его влияния на надпочечники при многократном введении диоксида путём распыления на заднюю стенку глотки в дозе 0,3 мл/животное (1600 ТД человека) в период введения и отсроченного наблюдения (в настоящее время данные не опубликованы).

По результатам ежедневного клинического наблюдения и еженедельного осмотра лабораторных животных, в месте введения препарата — в рото-

вой полости, на задней стенке глотки и на рядом расположенных тканях макроскопических изменений выявлено не было. При патологоанатомическом исследовании также отсутствовали макроскопические патологические изменения в желудке животных. У всех исследованных животных по окончании периодов введения и отсроченного наблюдения микроскопическое строение тканей задней стенки глотки соответствовало норме. Многослойный плоский эпителий и подлежащие мягкие ткани не имели признаков воспаления и дистрофии (рис. 1, а–г). Указанные данные показали отсутствие местного раздражающего или повреждающего действия тестируемого препарата в обеих дозах.

Для исключения признаков иммунотоксического действия были проанализированы гематологические и биохимические показатели крови, выполнена оценка массовых коэффициентов тимуса и селезёнки и гистологическое исследование тимуса, селезёнки и подчелюстных лимфатических узлов экспериментальных животных.

При анализе общего уровня лейкоцитов, содержания гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов, а также по биохимическому показателю уровня глобулинов в крови экспериментальных животных клинически значимых изменений выявлено не было как по окончании периода введения, так и по окончании периода отсроченного наблюдения (см. выше).

Анализ данных массовых коэффициентов тимуса и селезёнки животных не выявил статистически значимых отличий по окончании обоих периодов наблюдения. Макроскопическая оценка и гистологическое исследование тимуса, подчелюстных лимфатических узлов и селезёнки также не выявили признаков патологии (рис. 2, а–д и рис. 3, а–д).

Таким образом, многократное распыление на заднюю стенку глотки кроликов тестируемого препарата не оказало иммунотоксического влияния на гематологические и биохимические показатели крови, строение и массовые коэффициенты тимуса, селезёнки и строение подчелюстных лимфатических узлов животных.

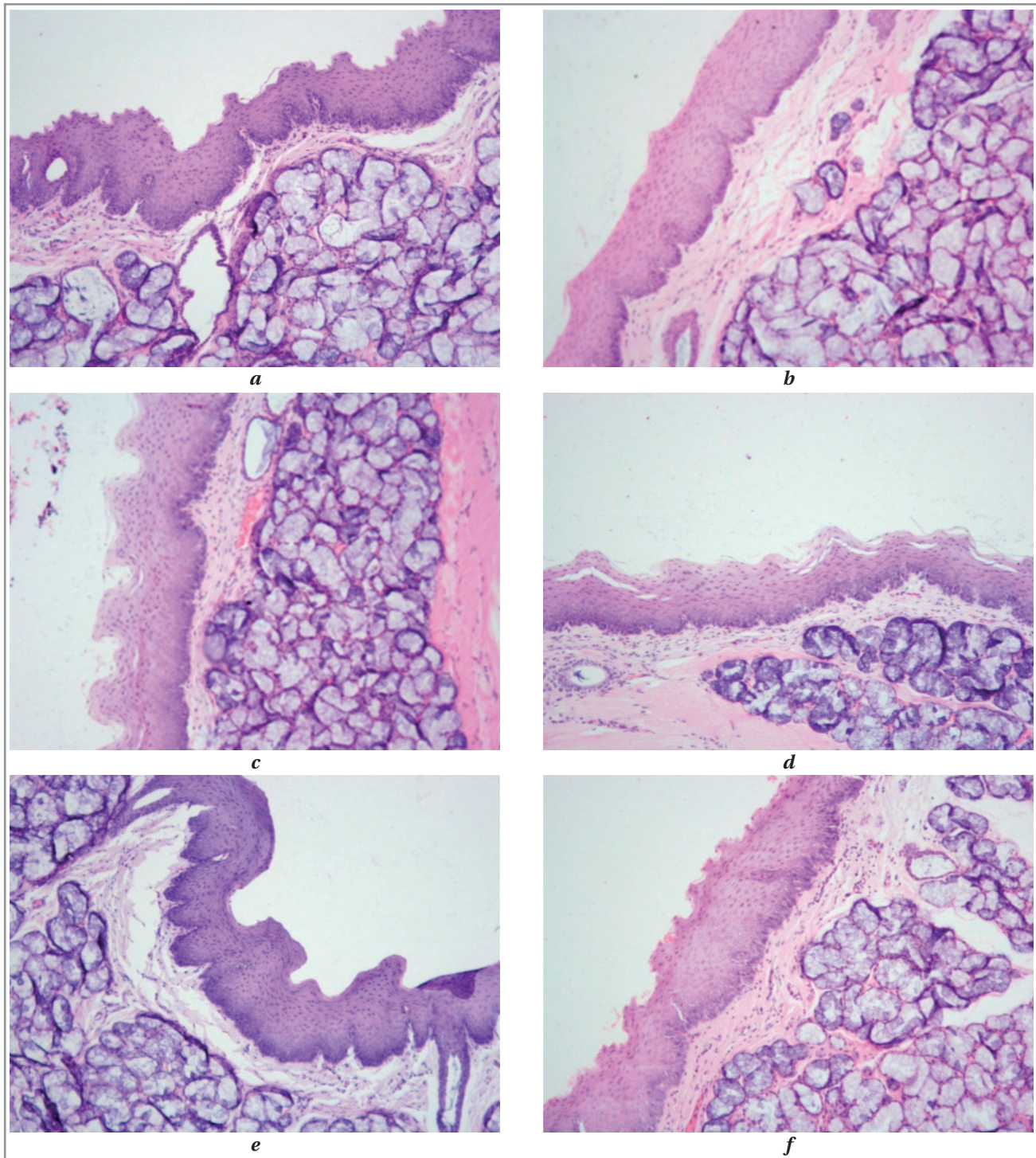


Рис. 1. Микропрепараты — срезы задней стенки глотки (место введения).

a — самца кролика из группы 1; *b* — самки кролика из группы 1; *c* — самца кролика из группы 2; *d* — самки из группы 2; *e* — самца из группы 3; *f* — самки из группы 3. В 6 препаратах патологические изменения отсутствуют. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 100$.

Fig. 1. Slides — sections of the posterior pharyngeal wall (injection site).

a — male rabbit from group 1; *b* — female rabbit from group 1; *c* — male rabbit from group 2; *d* — female from group 2; *e* — male from group 3; *f* — female from group 3. Pathological changes in 6 preparations were absent. Hematoxylin-eosin staining. Magnification $\times 100$.

Выводы

Проведённое доклиническое исследование токсичности, местной переносимости, иммуно-

токсичности и фармакологической безопасности тестируемого препарата Диоксидин®, раствор для местного и наружного применения, 0,25 мг/мл

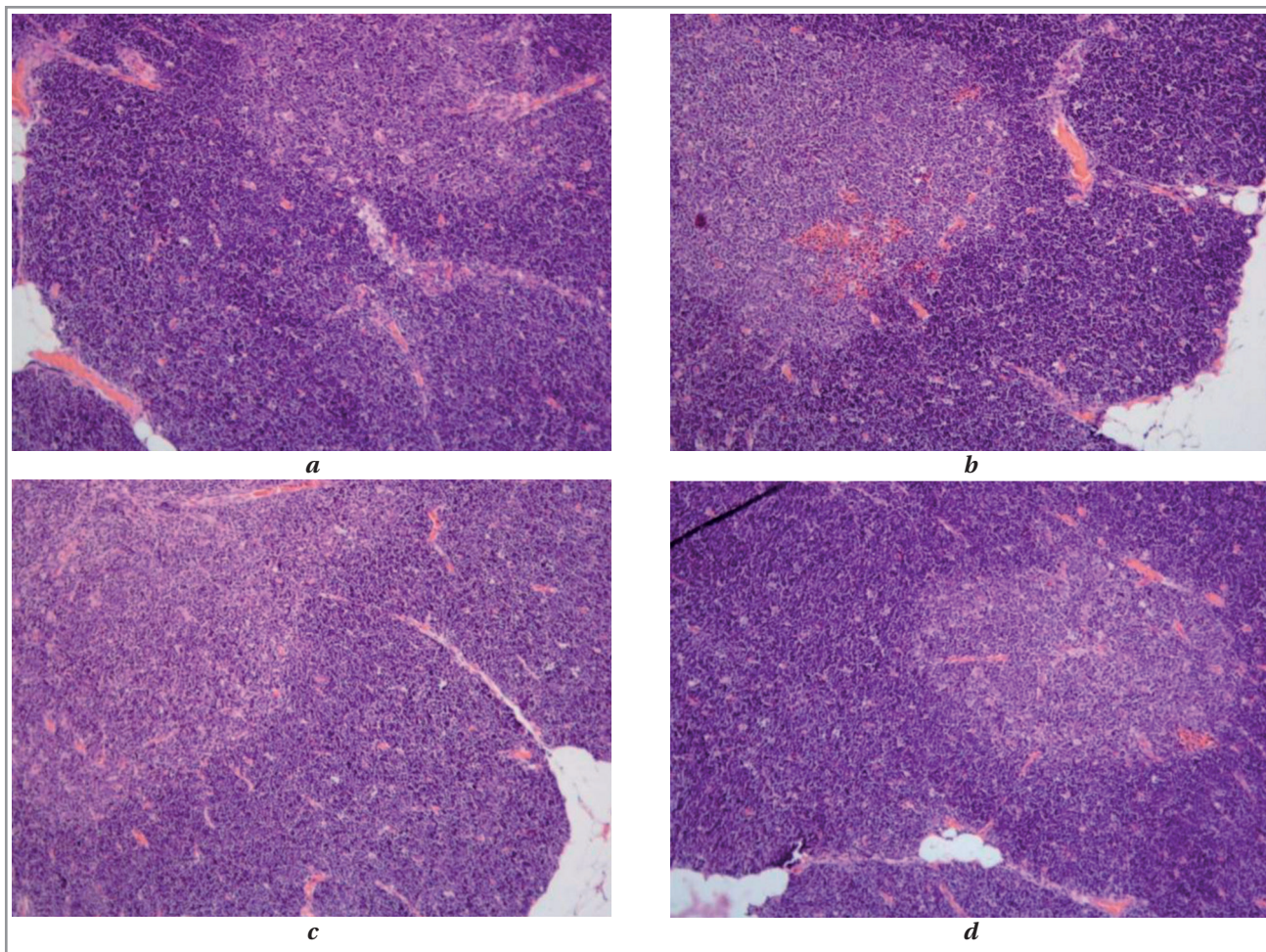


Рис. 2. Микропрепараты для оценки иммунотоксического действия – срезы тимуса (Т).

a — Т самца кролика из группы 1; *b* — Т самки кролика из группы 1; *c* — Т самца кролика из группы 3; *d* — Т самки из группы 3. В 4-х препаратах патологические изменения отсутствуют. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 100$.

Fig. 2. Slides for the assessment of immunotoxic effect - sections of the thymus (T).

a — T of a male rabbit from group 1; *b* — T of a female rabbit from group 1; *c* — T of a male rabbit from group 3; *d* — T of a female from group 3. There are no pathological changes in 4 preparations. Hematoxylin-eosin staining. Magnification $\times 100$.

(0,025%) (АО «Валента Фарм», Россия) при многократном распылении на заднюю поверхность глотки в течение 28 дней в суточных дозах 1,8 мл/животное (15,8–17,1 ТД человека массой 60 кг) и 4,0 мл/животное (35,1–37,1 ТД человека массой 60 кг) с периодом отсроченного наблюдения до 58-го дня позволило сделать следующие выводы:

1. На протяжении эксперимента гибель животных во всех экспериментальных группах отсутствовала. Введение тестируемого препарата не привело к развитию интоксикации и не повлияло на общее состояние животных.

2. По результатам оценки фармакологической безопасности тестируемого препарата, распыляемого на заднюю стенку глотки, кардиотоксического действия, влияния на дыхательную и центральную нервную системы не обнаружено.

3. По окончании периода введения токсического действия тестируемого препарата на осно-

вании лабораторных, клинико-инструментальных и морфологических показателей не выявлено. Органы-мишени токсического воздействия в рамках данного исследования не выявлены.

4. Отсроченных токсических эффектов на основании лабораторных, клинико-инструментальных и морфологических показателей не выявлено.

5. Введение тестируемого препарата в исследуемых дозах не вызывало патологических изменений в надпочечниках самцов и самок экспериментальных животных по результатам оценки, проведенной по окончании периодов введения и отсроченного наблюдения.

6. В рамках изучения иммунотоксических свойств тестируемый препарат, распыляемый на заднюю стенку глотки, не оказал негативного влияния на гематологические и биохимические показатели крови, строение и массовые коэффициенты тимуса, селезенки и строение подчелюстных лимфатических узлов животных.

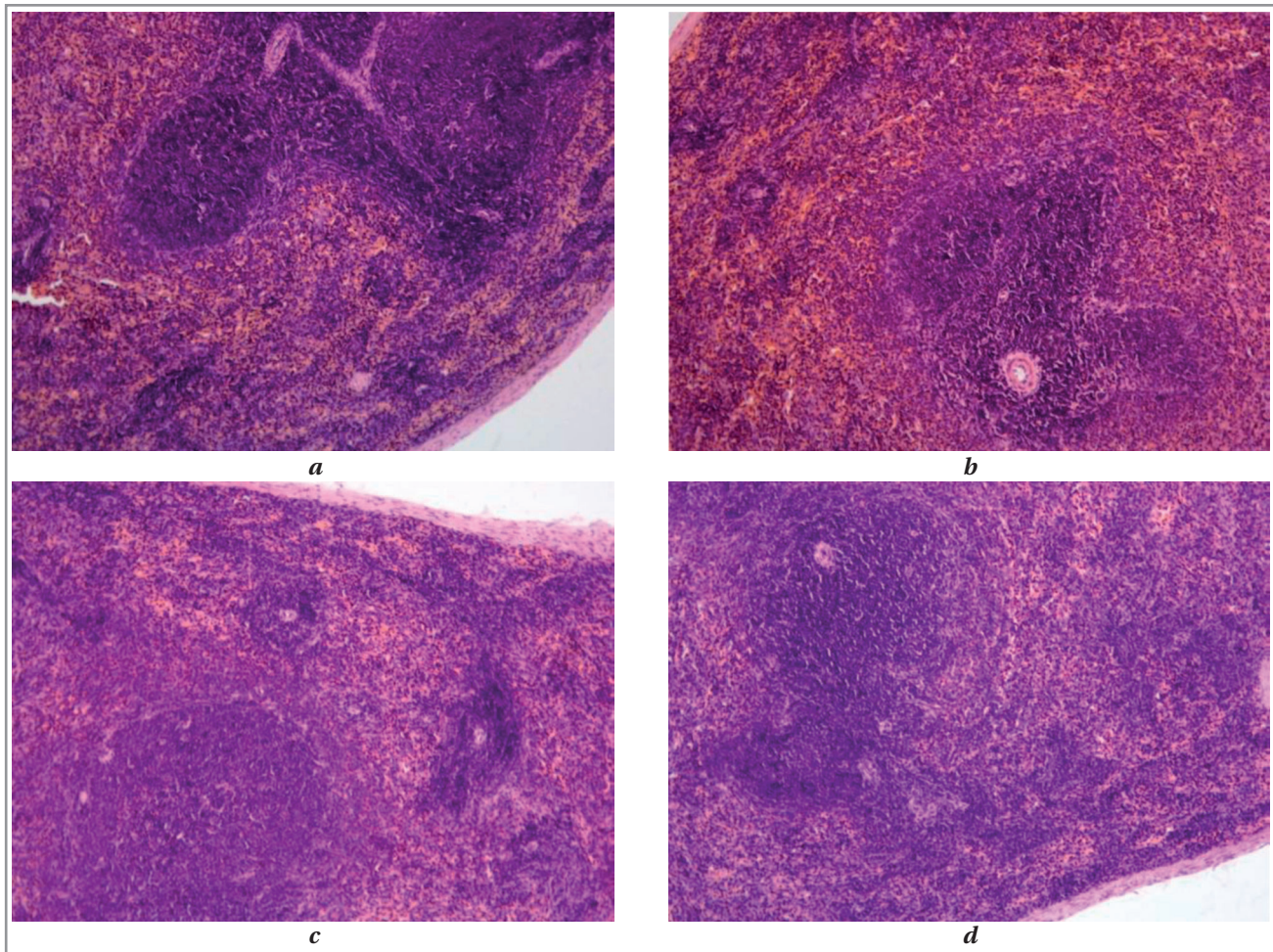


Рис. 3. Микропрепараты для оценки иммунотоксического действия — срезы селезёнки (С).

a — С самца из группы 1; *b* — С самки из группы 1; *c* — С самца из группы 3; *d* — С самки из группы 3. В 4-х препаратах патологические изменения отсутствуют. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 100$.

Fig. 3. Slides for the assessment of immunotoxic effect – sections of the spleen (C).

a — male from group 1; *b* — female from group 1; *c* — male from group 3; *d* — female from group 3. There were no pathological changes in 4 preparations. Hematoxylin-eosin staining. Magnification $\times 100$.

7. Многократное распыление на заднюю стенку глотки тестируемого препарата Диоксидин не вызвало патологических изменений в месте введения и прилежащих тканях животных на 29-й и 59-й дни эксперимента. Признаки местно-раздражающего действия при выбранных путях введения тестируемого препарата отсутствовали.

Заключение

Результаты проведённого токсикологического исследования показали, что тестируемый

препарат Диоксидин®, раствор для местного и наружного применения, 0,25 мг/мл (0,025%) (АО «Валента Фарм», Россия) при многократном распылении на заднюю поверхность глотки в течение 28 дней с периодом отсроченного наблюдения самцам и самкам кроликов породы «Белый великан» обладает удовлетворительным профилем безопасности для применения в широкой клинической практике в качестве препарата безрецептурного отпуска.

Литература/References

1. Приказ министерства здравоохранения СССР от 29 июня 1976 г. № 647 «О разрешении к медицинскому применению новых лекарственных средств». Доступно по: <https://doznko.ru/> (Ссылка активна на 10.09.22). / Prikaz ministerstva zdravoohraneniya SSSR ot 29 iyunya 1976 g. № 647 «O razreshenii k medicinskomu primeneniyu novykh lekarstvennykh sredstv». (In Russian). Available at: <https://doznko.ru/> (Accessed: 10.09.22).

2. Шамкина П.А., Кривопалов А.А., Панченко П.И., Рязанцев С.В. Возможности топической терапии бактериальных ЛОР-инфекций. Медицинский совет. 2021; 18: 44–54. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-18-44-54>. [Shamkina P.A., Krivopalov A.A., Panchenko P.I., Ryazancev S.V. Vozmozhnosti topicheskoy terapii bakterial'nyh LOR-infekcij. Medicinskij Sovet. 2021; 18: 44–54. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-18-44-54>. (in Russian)]
3. Падейская Е. Н. Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции. Инфекции и антимикроб тер. 2001; 5:

- 150–155. [Padejskaya E. N. Antibakterial'nyj preparat dioksidin: osobennosti biologicheskogo dejstviya i znachenie v terapii razlichnyh form gnojnoj infekcii. Infekcii i Antimikrob Ter. 2001; 5: 150–155. (in Russian)].
4. Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Гуров А.В., Изотова Г.Н., Романенко С.Г., Павлихин О.Г. и др. Возможности антисептических средств в ларингеальной и тонзиллярной патологии. Медицинский совет. 2016; 6: 36–40. Доступно по: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=26103969> (Ссылка активна на 10.09.22). [Kryukov A.I., Kunel'skaya N.L., Gurov A.V., Izotova G.N., Romanenko S.G., Pavlihin O.G. et al. Vozmozhnosti antisepticheskikh sredstv v laringeal'noj i tonsillyarnoj patologii. Medicinskij Sovet. 2016; 6: 36–40. Available at: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=26103969> (Accessed: 10.09.22). (in Russian)].
5. Свистушкин В.М., Никифорова Г.Н., Шевчик Е.В., Золотова А.В., Волкова К.Б. Возможности местного этиотропного лечения больных хроническим тонзиллитом. Медицинский совет. 2016; 18: 116–120. Доступно по: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=27474984> (Ссылка активна на 10.09.22). [Svistushkin V.M., Nikiforova G.N., Shevchik E.V., Zolotova A.V., Volkova K.B. Vozmozhnosti mestnogo etiotropnogo lecheniya bol'nykh hronicheskim tonsillitom. Medicinskij Sovet. 2016; 18: 116–120. Available at: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=27474984> (Accessed: 10.09.22). (in Russian)]
6. Овчинников А. Ю., Егян С. С. Наш опыт этиотропного лечения воспалительных заболеваний наружного и среднего уха. Российская оториноларингология. 2021; 20 (6): 115–124. [Ovchinnikov A. Yu., Egiyan S. S. Nash opyt etiotropnogo lecheniya vospalitel'nykh zabolevanij naruzhnogo i srednego uha. Rossijskaya Otorinolaringologiya. 2021; 20 (6): 115–124. <https://doi.org/10.18692/1810-4800-2021-6-115-124>. (in Russian)]
7. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Диоксидин® (рег.№ ЛП-Н(000404)-(РГ-РУ)-281021). Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routing-Guid=6d853302-58bb-4044-817c-016b45808420. (Ссылка активна на 10.09.22). [Instrukciya po medicinskomu primeneniyu lekarstvennogo preparata Dioksidin® (reg.№ LP-N(000404)-(RG-RU)-281021). Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routing-Guid=6d853302-58bb-4044-817c-016b45808420. (Accessed: 10.09.22). (in Russian)]
8. Приказ министерства здравоохранения Российской Федерации от 13 февраля 2013 года № 66 «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана её реализации». Доступно по: <https://base.garant.ru/70317532/> (Ссылка активна на 10.09.22). [Prikaz ministerstva zdoravoohraneniya Rossijskoj Federacii ot 13 fevralya 2013 goda № 66 «Ob utverzhdenii Strategii lekarstvennogo obespecheniya naseleniya Rossijskoj Federacii na period do 2025 goda i plana ee realizacii». (In Russian). Available at: <https://base.garant.ru/70317532/> (Accessed: 10.09.22). (in Russian)]
9. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (с изменениями и дополнениями). Доступно по: <http://ivo.garant.ru/#/document/12174909/paragraph/25019:0> (Ссылка активна на 10.09.22). / Federal'nyj zakon ot 12.04.2010 g. № 61-FZ «Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv» (s izmeneniyami i dopolneniyami). Available at: <http://ivo.garant.ru/#/document/12174909/paragraph/25019:0> (Accessed: 10.09.22). (in Russian)]
10. Миронов А.Н. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств. Т. 1. М.: ФГБУ «НЦЭСМП», 2012; 942. [Mironov A.N. Rukovodstvo po doklinicheskim issledovaniyam lekarstvennykh sredstv. T. 1. Moscow: FGBU «NCEMSP», 2012; 942. (in Russian)]
11. Решение Совета ЕЭК №81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г. Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/456026101> (Ссылка активна на 10.09.22). [Reshenie Soveta EEK №81 «Ob utverzhdenii pravil nadlezhashchej laboratornoj praktiki Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza v sfere obrashcheniya lekarstvennykh sredstv» ot 03.11.2016 g.. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/456026101> (Accessed: 10.09.22). (in Russian)]
12. Решение Коллегии ЕЭК № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов» от 26.11.2019 г. Доступно по: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evrazijskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-26112019_4/rukovodstvo-po-doklinicheskim-issledovaniyam-bezopasnosti (Ссылка активна на 10.09.22). / Reshenie Kollegii EEK № 202 «Ob utverzhdenii Rukovodstva po doklinicheskim issledovaniyam bezopasnosti v celyakh provedeniya klinicheskikh issledovanij i registracii lekarstvennykh preparatov» ot 26.11.2019 g. Available at: https://sudact.ru/law/reshenie-kollegii-evrazijskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-26112019_4/rukovodstvo-po-doklinicheskim-issledovaniyam-bezopasnosti (Accessed: 10.09.22). (in Russian)]
13. Решение Совета ЕЭК №78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» от 03.11.2016 г. Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/552305024> (Ссылка активна на 10.09.22). / Reshenie Soveta EEK №78 «O Pravilah registracii i ekspertizy lekarstvennykh sredstv dlya medicinskogo primeneniya» ot 03.11.2016 g. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/552305024> (Accessed: 10.09.22). (in Russian)]
14. Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS), 5th revised edition // United Nations. – 2013. – 536 p. Доступно по: https://unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/English/ST-SG-AC10-30-Rev5e.pdf (Ссылка активна на 10.09.22).
15. OECD guidelines for testing of chemicals: Repeated dose dermal toxicity: 21/28-day study. OECD guideline for testing chemicals Publishing, Paris. 1981, 410: 1–8. <https://doi.org/10.1787/9789264070745-en>
16. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях / пер. с англ. Под ред. М.С. Красильщиковой, И.В. Белозерцевой. СПб.: 2012; 48. [Direktiva 2010/63/EU Evropejskogo Parlamenta i Soveta Evropejskogo Soyuz po ohrane zhivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh celyah / per. s angl. Pod red. M.S. Krasil'shchikovej, I.V. Belozercevoj. SPb.: 2012; 48. (in Russian)].
17. Washington I.M., Van Hooser G. (2012). Clinical biochemistry and hematology. In: The laboratory rabbit, Guinea pig, hamster, and other rodents, pp. 57–116. doi: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1.
18. Melillo A. Rabbit clinical pathology. J Exot Pet Med. 2007; 16 (3): 135–145. doi: 10.1053/j.jepm.2007.06.002. Epub 2007 Sep 18.

Информация об авторах

Журавлёва Марина Владимировна — д. м. н., профессор, научный отдел клинической фармакологии Института исследований и разработок, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; профессор, кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-9198-8661

Рощина Елизавета Анатольевна — научный сотрудник отдела специфической токсикологии и фармакодинамики, АО «НПО «Дом Фармации», Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0002-9257-4241

Лосева Екатерина Александровна — врач-патоморфолог отдела гистологии и патоморфологии, АО «НПО «Дом Фармации», Ленинградская обл., Россия. ORCID: 0000-0002-4668-217X

Гуров Александр Владимирович — д. м. н., профессор, кафедра оториноларингологии лечебного факультета, кафедра микробиологии, ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова»; ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л. И. Свержевского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9811-8397

About the authors

Marina V. Zhuravleva — D. Sc. in medicine, Professor, Scientific Department of Clinical Pharmacology of the Institute of Research and Development, Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation; Professor, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-9198-8661

Elizabeth A. Roshchina — Researcher of the Department of Specific Toxicology and Pharmacodynamics, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0002-9257-4241

Catherine A. Loseva — pathologist of the Department of Histology and Pathomorphology, RMC «HOME OF PHARMACY» JSC, Leningrad region, Russia. ORCID: 0000-0002-4668-217X

Alexander V. Gurov — D. Sc. in medicine, Professor, Pirogov Russian National Research Medical University; Sverzhnevsky Scientific and Research Otolaryngology Clinical Institute, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9811-8397

Безопасность комбинированной векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) у пациентов с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями: предварительные данные

А. Н. КУЛИКОВ, *Н. В. МУРАВЬЕВА, Б. С. БЕЛОВ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия

Safety of Gam-COVID-Vac (Sputnik V) Combined Vector Vaccine in Patients With Immunoinflammatory Rheumatic Diseases: Preliminary Data

ALEKSANDR N. KULIKOV, *NATALIA V. MURAVYEVA, BORIS S. BELOV

V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia

Резюме

Актуальность. Больные иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями (ИВРЗ) подвержены высокому риску развития COVID-19. Эффективным методом профилактики этого заболевания должна стать вакцинация, которая может быть небезопасной у больных ИВРЗ.

Цель исследования. Оценка безопасности Гам-КОВИД-Вак у пациентов с ИВРЗ в реальной клинической практике. **Материал и методы.** Проведено одномоментное исследование. Основную группу составили больные ИВРЗ, контрольную группу — лица без ИВРЗ. Все участники были опрошены врачом-исследователем с заполнением унифицированной анкеты, дополнительную информацию получали из медицинской документации.

Результаты. В исследование включено 222 пациента с ИВРЗ (119 — с ревматоидным артритом, 36 — анкилозирующим спондилитом, 17 — псориатическим артритом, 17 — болезнью Шегрена, 10 — недифференцированным спондилоартритом, 8 — системной красной волчанкой, 4 — метаболическим артритом, 3 — системной склеродермией, 3 — системным васкулитом, 2 — ревматической полимиалгией, 2 — недифференцированным системным заболеванием соединительной ткани, 1 — болезнью Стилла взрослых) и 111 испытуемых без ИВРЗ. Число больных ИВРЗ, у которых было зарегистрировано сочетание местных и системных нежелательных явлений (НЯ) на введение первого компонента вакцины, было значительно меньше, чем в контрольной группе (22,1 и 44,1%, соответственно, $p < 0,001$). Подобные различия отмечены также после введения второго компонента (14,0 и 29,7%, соответственно, $p < 0,001$). Такие НЯ, как боль в месте инъекции без ограничения движения, слабость, лихорадка, артралгии/миалгии, головная боль и озноб значительно чаще встречались в контрольной группе после введения первого компонента вакцины. После полной иммунизации НЯ отсутствовали у 35,6% пациентов ИВРЗ и у 21,6% лиц контрольной группы ($p = 0,01$). Обострений ИВРЗ и новых аутоиммунных феноменов не зарегистрировано ни в одном случае.

Выводы. Согласно предварительным данным, иммунизация пациентов с ИВРЗ комбинированной векторной вакциной Гам-КОВИД-Вак представляется достаточно безопасной.

Ключевые слова: иммуновоспалительные ревматические заболевания; вакцинация; COVID-19; Гам-КОВИД-Вак; Спутник V; безопасность; нежелательные явления

Для цитирования: Куликов А. Н., Муравьева Н. В., Белов Б. С. Безопасность комбинированной векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) у пациентов с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями: предварительные данные. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 7–8: 33–39. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-33-39>.

Abstract

Background. Patients with autoimmune and inflammatory rheumatic diseases (AIRDs) are at high risk of developing COVID-19. Vaccination is an effective method of preventing this disease, which may be unsafe for patients with AIRDs.

The aim of the study is to assess the safety of Gam-COVID-Vac in patients with IVD in real clinical practice.

Material and methods. A cross-sectional study was carried out. The main group consisted of patients with AIRDs, the control group consisted of individuals without AIRDs. All participants were interviewed by the research physician using a unified questionnaire, additional information was obtained from medical records.

Results. The study included 222 patients with AIRDs (119 with rheumatoid arthritis, 36 with ankylosing spondylitis, 17 with psoriatic arthritis, 17 with Sjögren's disease, 10 with undifferentiated spondyloarthritis, 8 with systemic lupus erythematosus, 4 with metabolic arthritis, 3 with systemic scleroderma, 3 with systemic vasculitis, 2 with polymyalgia

rheumatica, 2 with undifferentiated systemic connective tissue disease, 1 with adult Still's disease) and 111 patients without AIRDs. The number of patients with AIRDs who had a combination of local and systemic adverse events (AE) on the introduction of the first component of the vaccine was significantly less than in the control group (22.1 and 44.1%, respectively, $P<0.001$). Similar differences were also noted after the introduction of the second component (14.0 and 29.7%, respectively, $P<0.001$). AEs such as pain at the injection site without restriction of movement, weakness, fever, arthralgia/myalgia, headache, and chills were significantly more common in the control group after the introduction of the first component of the vaccine. After complete immunization, AEs were absent in 35.6% of patients with AIRDs and in 21.6% of control group patients ($P=0.01$). Exacerbations of AIRDs and new autoimmune phenomena were not registered in any cases.

Conclusions. According to preliminary data, immunization of patients with AIRDs with the Gam-COVID-Vac combined vector vaccine appears to be quite safe.

Keywords: autoimmune and inflammatory rheumatic diseases; vaccination; COVID-19; Gam-COVID-Vac; Sputnik V; safety; adverse events

For citation: Kulikov A.N., Muravyeva N.V., Belov B.S. Safety of Gam-COVID-Vac (Sputnik V) combined vector vaccine in patients with immunoinflammatory rheumatic diseases: preliminary data. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 7–8: 33–39. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-33-39>.

Введение

Несмотря на то, что с начала пандемии прошло два года, проблема COVID-19 по-прежнему не теряет своей актуальности: в мире всё ещё регистрируются новые случаи заболевания, в том числе требующие госпитализации и проведения интенсивных методов терапии, сохраняется риск летального исхода у определённой категории пациентов.

Известно, что основными факторами риска тяжёлого течения и смерти от COVID-19 являются пожилой возраст и наличие сопутствующих заболеваний. С учётом того, что больные иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями (ИВРЗ) имеют высокий риск развития инфекций, обусловленный как аутоиммунными нарушениями, так и влиянием иммуносупрессивных препаратов, COVID-19 представляет существенную опасность для лиц этой когорты [1]. Это положение подтверждается данными двух метаанализов, согласно которым для пациентов с ИВРЗ характерен более высокий риск инфицирования SARS-CoV-2, госпитализаций и летального исхода [2, 3].

Наиболее эффективным методом профилактики инфекций или предотвращения их тяжёлого течения является вакцинация. Это особенно актуально для больных ИВРЗ, поскольку коморбидные инфекции, осложняя основное заболевание, препятствуют проведению адекватной терапии и, следовательно, ухудшают прогноз. В то же время разработка вакцин является длительным процессом и обычно занимает 10–15 лет, что не может быть приемлемым в условиях текущей пандемии COVID-19. В связи с этим рядом регуляторных органов (как зарубежных, так и отечественных) было принято решение об экстренной регистрации вакцин против COVID-19 и применении их в клинической практике [4]. Однако вынужденное ускоренное использование вакцин сопряжено с недостаточным количеством данных

об их эффективности и безопасности, особенно у пациентов с ИВРЗ, которые не были включены в протоколы исследований. В частности, в 3 фазу рандомизированного контролируемого исследования эффективности и безопасности комбинированной векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) — наиболее широко применяемой в Российской Федерации — не были включены лица, принимавшие глюкокортикоиды (ГК) в течение 30 дней или какую-либо иммуносупрессивную терапию в течение 3 мес. до планируемой вакцинации [5].

Вместе с тем безопасность любой вакцины является основополагающим принципом иммунизации больных ИВРЗ из-за теоретического риска обострения заболевания или формирования новых аутоиммунных феноменов. Учитывая малочисленность данных по этой проблеме в отношении Гам-КОВИД-Вак у больных ИВРЗ, мы выполнили собственное исследование безопасности указанной вакцины.

Цель исследования — оценить безопасность комбинированной векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак у пациентов с ИВРЗ в реальной клинической практике.

Материал и методы

Исследование проводилось с 12 октября 2021 г. по 18 марта 2022 г. Выборка была сформирована путём последовательного сплошного включения больных, поступивших на стационарное лечение ($n=192$, 86,5%) или обратившихся в консультативно-диагностический центр ($n=30$, 13,5%) ФГБНУ Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой. Контрольную группу составили 111 испытуемых без каких-либо ИВРЗ. Работа одобрена Локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой. После подписания добровольного информированного согласия об участии в исследовании все участники были опрошены врачом-исследователем с заполнением унифицированной анкеты, дополнительную информацию получали из медицинской документации.

Статистическая обработка материала проведена с использованием прикладного пакета программ Statistica 11.0 (StatSoft, США). Различия считали значимыми при $p<0,05$.

Таблица 1. Коморбидная патология и предшествующая вакцинация у пациентов с ИВРЗ и у лиц контрольной группы**Table 1. Comorbidity and previous vaccination in patients with AIRDs and in control group**

Показатель	ИВРЗ (n=222) n (%)	Контроль (n=111) n (%)	p
Коморбидная патология			
Гипертоническая болезнь	75 (33,8)	18 (16,2)	<0,001
Ожирение	40 (18,0)	9 (8,1)	0,017
Ишемическая болезнь сердца	12 (5,4)	2 (1,8)	>0,05
Сахарный диабет	10 (4,5)	4 (3,6)	>0,05
Хроническая сердечная недостаточность	5 (2,3)	1 (0,9)	>0,05
Туберкулёз лёгких	5 (2,3)	0	>0,05
Фибрилляция предсердий	5 (2,3)	1 (0,9)	>0,05
Онкологические заболевания	5 (2,3)	0	>0,05
ОНМК	4 (1,8)	0	>0,05
Хроническая болезнь почек	3 (1,4)	1 (0,9)	>0,05
Хронический гепатит В	3 (1,4)	0	>0,05
Бронхиальная астма	2 (0,9)	1 (0,9)	>0,05
Хроническая обструктивная болезнь лёгких	2 (0,9)	0	>0,05
Инфаркт миокарда	2 (0,9)	1 (0,9)	>0,05
Первичный билиарный холангит	2 (0,9)	0	>0,05
АА-амилоидоз	2 (0,9)	0	>0,05
Хронический гепатит С	1 (0,5)	0	>0,05
Саркоидоз лёгких	1 (0,5)	0	>0,05
Вакцинация за последние 3 года			
Против гриппа	37 (16,7)	61 (55)	<0,001
Против пневмококковой инфекции	22 (9,9)	13 (11,7)	>0,05
Против кори	15 (6,8)	7 (6,3)	>0,05
Против дифтерии и столбняка	5 (2,3)	9 (8,1)	0,013
Против гепатита В	0	12 (10,8)	<0,001
НЯ после вакцинации	8 (3,6)	19 (17,1)	<0,001

Примечание. ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения; НЯ — нежелательные явления.

Note. ОНМК — acute cerebrovascular accident; НЯ — adverse events.

Результаты исследования

В исследование включены 222 пациента с ИВРЗ: 171 женщина, 51 мужчина, возраст $49,0 \pm 15,5$ лет, длительность заболевания $10,6 \pm 8,4$ лет. У 119 больных диагностирован ревматоидный артрит (РА), у 36 — анкилозирующий спондилит, у 17 — псориатический артрит, у 17 — болезнь Шегрена, у 10 — недифференцированный спондилоартрит, у 8 — системная красная волчанка, у 4 — метаболический артрит, у 3 — системная склеродермия, у 3 — системный васкулит, у 2 — ревматическая полимиалгия, у 2 — недифференцированное системное заболевание соединительной ткани, у 1 — болезнь Стилла взрослых. Большинство пациентов (59,9%) принимали базисные противовоспалительные препараты: 69 — метотрексат, 29 — лефлуномид, 22 — гидроксихлорохин, 20 — сульфасалазин, 3 — микофенолата мофетил, 2 — азатиоприн. 81 больной получал генно-инженерные биологические препараты: 58 — ритуксимаб, 14 — ингибиторы фактора некроза опухоли- α , 3 — абатацепт, 3 — ингибиторы интерлейкина 17A, 2 — тоцилизумаб. Один пациент принимал тофацитиниб. Терапия ГК проводилась 77 больным. 20 пациентов принимали только нестероидные противовоспалительные

препараты. Не получали противоревматическую терапию 32 пациента.

Контрольную группу составили 111 лиц без ИВРЗ: 84 женщины, 27 мужчин, возраст $37,2 \pm 15,7$ лет.

Все участники исследования были вакцинированы двумя компонентами векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак.

Как видно из табл. 1, в структуре коморбидной патологии у больных ИВРЗ по сравнению с лицами без ИВРЗ значимо чаще встречались гипертоническая болезнь и ожирение, что, вероятно, связано с более молодым возрастом лиц контрольной группы, а также с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний на фоне ИВРЗ. Испытуемые из контрольной группы были вакцинированы против гриппа, дифтерии и столбняка, гепатита В значимо чаще, чем больные с ИВРЗ, в то время как частота вакцинации против пневмококковой инфекции и кори в обеих группах значимо не различалась. В то же время, по данным анамнеза, какие-либо нежелательные явления (НЯ) после иммунизации указанными вакцинами значимо реже встречались у пациентов с ИВРЗ.

После вакцинации Гам-КОВИД-Вак местные и системные поствакцинальные НЯ были зарегистрированы как у больных ИВРЗ, так и в контрольной группе (табл. 2).

Таблица 2. НЯ после введения первого и второго компонента Гам-КОВИД-Вак
Table 3. AEs after administration of the first and second components of Gam-COVID-Vac

НЯ	Первый компонент			Второй компонент		
	ИВРЗ (n=222)	Контроль (n=111)	p	ИВРЗ (n=222)	Контроль (n=111)	p
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Местные НЯ						
Боль б/о движения	50 (22,5)	38 (34,2)	0,023	32 (14,4)	29 (26,1)	0,01
Боль с/о движения	21 (9,5)	12 (10,8)	>0,05	9 (4,1)	7 (6,3)	>0,05
Отёк или гиперемия	20 (9,0)	14 (12,6)	>0,05	14 (6,3)	12 (10,8)	>0,05
Системные НЯ						
Слабость	63 (28,4)	48 (43,2)	0,007	60 (27,0)	33 (29,7)	>0,05
Температура >37,0°C	55 (24,8)	57 (51,4)	<0,001	50 (22,5)	34 (30,6)	>0,05
37,0–38,0°C	46 (20,7)	36 (32,4)	0,02	36 (16,2)	22 (19,8)	>0,05
>38,0°C	9 (4,1)	21 (18,9)	<0,001	14 (6,3)	12 (10,8)	>0,05
Артралгии/миалгии	24 (10,8)	35 (31,5)	<0,001	23 (10,4)	21 (18,9)	0,03
Головная боль	17 (7,7)	17 (15,3)	0,03	16 (7,2)	7 (6,3)	>0,05
Озноб	9 (4,1)	31 (27,9)	<0,001	10 (4,5)	10 (9,0)	>0,05
Тошнота или рвота	5 (2,3)	2 (1,8)	>0,05	4 (1,8)	1 (0,9)	>0,05
Головокружение	5 (2,3)	1 (0,9)	>0,05	4 (1,8)	0	>0,05
Сонливость	5 (2,3)	0	>0,05	4 (1,8)	0	>0,05
Повышение АД	2 (0,9)	1 (0,9)	>0,05	3 (1,4)	1 (0,9)	>0,05
Потливость	1 (0,5)	1 (0,9)	>0,05	3 (1,4)	0	>0,05
Диарея	0	1 (0,9)	>0,05	3 (1,4)	0	>0,05
Сыпь	0	0	>0,05	3 (1,4)	0	>0,05
Другие	8 (3,6)	2 (1,8)	>0,05	5 (2,3)	2 (1,8)	>0,05
Количество НЯ						
1 СНЯ	36 (16,2)	24 (21,6)	>0,05	35 (15,8)	22 (19,8)	>0,05
2 СНЯ	30 (13,5)	10 (9,0)	>0,05	25 (11,3)	11 (9,9)	>0,05
3 СНЯ	17 (7,7)	17 (15,3)	0,03	19 (8,6)	9 (8,1)	>0,05
>3 СНЯ	10 (4,5)	22 (19,8)	<0,001	10 (4,5)	8 (7,2)	>0,05
1 МСНЯ	45 (20,3)	14 (12,6)	>0,05	40 (18,0)	17 (15,3)	>0,05
2 МСНЯ	30 (13,5)	19 (17,1)	>0,05	26 (11,7)	17 (15,3)	>0,05
3 МСНЯ	22 (9,9)	12 (10,8)	>0,05	18 (8,1)	8 (7,2)	>0,05
>3 МСНЯ	23 (10,4)	34 (30,6)	<0,001	20 (9,0)	16 (14,4)	>0,05

Примечание. С/о — с ограничением; б/о — без ограничения; АД — артериальное давление; СНЯ — системное нежелательное явление; МСНЯ — местные и/или системные нежелательные явления.

Note. C/o — with restriction; b/o — without restriction; АД — blood pressure; СНЯ — systemic adverse event; МСНЯ — local and/or systemic adverse events.

После иммунизации первым компонентом вакцины в контрольной группе значимо чаще встречались боль в месте инъекции без ограничения движений конечности, слабость, лихорадка (в том числе выше 38,0°C), артралгии/миалгии, головная боль и озноб. Число больных ИВРЗ с тремя и более системными НЯ, а также с четырьмя и более местными и/или системными НЯ было значимо меньше, чем в контрольной группе. Только местные НЯ зарегистрированы у 27 (12,2%) пациентов с ИВРЗ и у 6 (5,4%) испытуемых из контрольной группы, в то время как системные НЯ — у 44 (19,8%) и 24 (21,6%), соответственно ($p>0,05$). Вместе с тем число пациентов с ИВРЗ, у которых было отмечено сочетание местных и системных НЯ на введение первого компонента вакцины, было значимо меньше, чем в контрольной группе (22,1 и 44,1%, соответственно; $p<0,001$). После иммунизации первым компонентом вакцины какие-либо НЯ не выявлены у 45,9% больных ИВРЗ по сравнению с 28,8% лиц контрольной группы ($p=0,003$). Серьезных НЯ не зарегистрировано.

После введения второго компонента вакцины в контрольной группе наиболее часто встречались боль в месте инъекции без ограничения движений конечности ($p=0,01$), артралгии/миалгии ($p=0,03$), а также слабость, повышение температуры тела, головная боль и озноб (однако значимые различия не получены). В отличие от первого компонента не выявлено значимых различий в числе больных ИВРЗ с тремя и более системными НЯ, с четырьмя и более местными и/или системными НЯ по сравнению с контрольной группой. Частота пациентов с ИВРЗ, у которых зарегистрированы только системные НЯ, оказалась значимо большей, чем среди испытуемых из контрольной группы — 26,1 и 15,3%, соответственно ($p=0,026$). Доля пациентов с ИВРЗ, у которых после иммунизации вторым компонентом вакцины отмечены как местные, так и системные НЯ, была значимо меньшей при сопоставлении с контрольной группой — 14,0 и 29,7%, $p<0,001$. Кроме того, число больных ИВРЗ, у которых отсутствовали какие-либо НЯ, оказалось большим по сравнению с контрольной группой (53,2 и 47,4% случаев,

соответственно), однако различия были статистически не значимы. Серьёзных НЯ на введение второго компонента также не зарегистрировано.

После полной вакцинации какие-либо НЯ отсутствовали у 35,6% больных ИВРЗ и 21,6% лиц контрольной группы ($p=0,01$). Эти данные могут свидетельствовать о лучшей переносимости Гам-КОВИД-Вак у пациентов с ИВРЗ.

Мы сравнили переносимость Гам-КОВИД-Вак у больных ИВРЗ в двух возрастных группах: первая — до 60 лет ($n=159$, 116 женщин, 43 мужчины, длительность заболевания $9,9\pm 8,2$ лет), вторая — старше 60 лет ($n=63$, 55 женщин, 8 мужчин, длительность заболевания $12,4\pm 8,7$ лет). Оказалось, что после введения первого компонента лихорадка и слабость выявлялись значимо чаще у пациентов младше 60 лет (28,9 и 14,3%, $p=0,023$ и 33,3 и 15,9%, $p=0,01$, соответственно). Кроме того, у этой категории больных как на введение первого, так и второго компонента вакцины чаще встречались боль в месте инъекции без ограничения движений, артралгии/миалгии и головная боль, однако значимых различий выявлено не было. Более того, число пациентов с четырьмя и более местными и/или системными НЯ, которые развились после иммунизации первым компонентом, было значимо большим в первой группе (13,2 и 3,2%, $p=0,028$). В то же время значимых отличий между группами в числе больных с сочетанием местных и системных НЯ (25,2 и 14,3% после введения первого компонента, 15,1 и 11,1% — второго компонента) и без каких-либо НЯ (43,4 и 52,4% после введения первого компонента, 54,1 и 50,8% — второго компонента, 35,8 и 34,9% после полной вакцинации) не выявлено. В целом, несмотря на малый размер выборки, можно предварительно сказать, что в указанных возрастных группах переносимость Гам-КОВИД-Вак существенно не отличается.

Мы сопоставили переносимость Гам-КОВИД-Вак у больных воспалительными заболеваниями суставов ($n=187$, 137 женщин, 50 мужчин, возраст $48,5\pm 15,2$ лет, длительность заболевания $11,2\pm 8,5$ лет) и системными ИВРЗ ($n=35$, 34 женщины, 1 мужчина, возраст $51,3\pm 16,9$ лет, длительность заболевания $7,5\pm 7,0$ лет). Оказалось, что отёк или гиперемия в месте инъекции после введения первого компонента вакцины значимо чаще наблюдались у больных системными ИВРЗ (4,8 и 31,4%, $p<0,001$). Отмечена более высокая частота встречаемости других местных НЯ, а также лихорадки, слабости, болей в мышцах или суставах, головной боли на оба компонента вакцины у пациентов с системными ИВРЗ по сравнению с больными воспалительными заболеваниями суставов, однако эти различия не были значимыми. Также доля пациентов с четырьмя и более местными и/или системными НЯ, которые возникли после иммуни-

зации первым компонентом вакцины, была значимо большей в группе системных ИВРЗ (7,0 и 28,6%, $p<0,001$). Вместе с тем не выявлено значимых различий в отношении числа пациентов, у которых наблюдались местные и системные НЯ (19,8 и 34,3% на первый компонент, 12,8 и 20% на второй компонент) и не зарегистрировано ни одного НЯ (48,7 и 31,4% после введения первого компонента, 55,1 и 42,9% — второго компонента, 37,4 и 25,7% — после полной иммунизации). В целом, несмотря на малый размер выборки, можно предположить, что в указанных группах переносимость Гам-КОВИД-Вак существенно не отличается.

После полной вакцинации 2 (0,9%) пациента с РА сообщили об усилении артралгий и появлении кратковременной утренней скованности, при этом маркёры системного воспаления (СОЭ, С-реактивный белок) оставались в пределах нормы. Указанные симптомы разрешились самостоятельно без назначения какой-либо терапии. Предположение об обострении РА отвергнуто в обоих случаях, указанная симптоматика расценена как поствакцинальная реакция.

Формирования новых аутоиммунных феноменов не зарегистрировано ни у одного испытуемого.

Обсуждение

Предварительные результаты проведённого нами исследования свидетельствуют об удовлетворительной безопасности Гам-КОВИД-Вак у пациентов с ИВРЗ, что согласуется с данными других отечественных учёных [6]. Так, в исследовании Н. М. Буланова и соавт., основную группу составили 157 пациентов с ИВРЗ, контрольную — 168 лиц без каких-либо ревматических заболеваний. Авторы показали, что НЯ встречаются реже в основной группе как после полной вакцинации (78,3 и 89,3%, соответственно, $p=0,01$), так и после введения первого (но не второго) компонента (72,0 и 82,7%, соответственно, $p=0,024$). Подобные результаты были продемонстрированы в нашей более ранней работе, в которой была исследована суммарная безопасность различных вакцин (Спутник V, Спутник Лайт, КовиВак, ЭпиВакКорона, Pfizer/BioNTech) против COVID-19. Какие-либо НЯ у пациентов с ИВРЗ отсутствовали значимо чаще как после полной вакцинации (35,8 и 21%, $p=0,006$), так и после иммунизации первым (но не вторым) компонентом (46,1 и 30,5%, соответственно, $p=0,005$) [7]. Сходные данные об удовлетворительной переносимости преимущественно мРНК вакцин против COVID-19 у пациентов с ИВРЗ были получены зарубежными исследователями [8–10].

В нашем исследовании обострение ИВРЗ изначально предполагалось у 2 (0,9%) пациентов, однако при дальнейшем наблюдении возникшая

симптоматика расценена как поствакцинальная реакция. О небольшой частоте обострений ИВРЗ на фоне иммунизации против COVID-19 также свидетельствуют зарубежные учёные [11, 12]. Вместе с тем, некоторые авторы показали более высокую частоту обострений ИВРЗ [6, 10, 13, 14]. Однако установить достоверную частоту обострений в рамках этих исследований не представляется возможным, поскольку данные были получены путём интернет-опроса. Более того, согласно обзору литературы отечественных учёных, частота обострений ИВРЗ после вакцинации против COVID-19 представляется достаточно низкой (5–7%) и не имеет достоверных ассоциаций с проводимой противоревматической терапией или конкретной вакциной [4].

Следует подчеркнуть, что в реальной клинической практике установить достоверную связь между вакцинацией и обострением ИВРЗ крайне сложно — признаки активности заболевания достаточно разнообразны, а лихорадка, артралгии, миалгии и утомляемость являются, как было показано выше, частыми поствакцинальными НЯ. Кроме того, интерпретация указанных симптомов должна осуществляться исключительно врачом с учётом объективного осмотра пациента и анализа имеющихся лабораторных данных (динамика маркёров воспаления и иммунологической активности). По-видимому, обострение ИВРЗ после вакцинации можно диагностировать с большей долей вероятности только у больных, находившихся до иммунизации в достаточно длительной клинико-лабораторной медикаментозной или безмедикаментозной ремиссии, у которых вновь отмечается появление клинических симптомов заболевания, повышение маркёров воспаления и иммунологической активности, и особенно в тех случаях, когда регресс симптоматики достигается именно за счёт эскалации иммуносупрессивной терапии.

Литература/References

1. Белов Б.С., Муравьева Н.В., Тарасова Г.М. COVID-19: ревматологические аспекты. Эффективная фармакотерапия. 2020; 16 (16): 18–25. <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2020-16-16-18-25>. [Belov B.S., Muravyova N.V., Tarasova G.M. COVID-19: Rheumatological Aspects. Effective Pharmacotherapy. 2020; 16 (16): 18–25. <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2020-16-16-18-25> (in Russian)]
2. Akiyama S., Hamdeh S., Micic D., Sakuraba A. Prevalence and clinical outcomes of COVID-19 in patients with autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. Ann Rheum Dis. 2020 Oct; annrheumdis-2020-218946. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-218946. Online ahead of print.
3. Conuay R., Grimshaw A.A., Konig M.F., Putman M., Duarte-Garcia A., Tsenget L.Y. et al. SARS-CoV-2 infection and COVID-19 outcomes in rheumatic disease: a systematic literature review and meta-analysis. Arthritis Rheumatol. 2022; 74 (5): 766–775. doi: 10.1002/art.42030.
4. Белов Б.С., Лила А.М., Насонов Е.Л. Вакцинация против SARS-CoV-2 при ревматических заболеваниях: вопросы безопасности. Научно-практическая ревматология. 2022; 60 (1): 21–31. <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2022-21-31>. [Belov B.S., Lila A.M., Nasonov E.L. Vaccination against SARS-CoV-2 in rheumatic diseases: Safety issues. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2022; 60 (1): 21–31. <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2022-21-31> (in Russian)]

Авторы абсолютно уверены, что возможная минимальная вероятность обострения ИВРЗ после вакцинации не является препятствием для проведения иммунизации против COVID-19. Безусловно, уменьшение риска инфицирования SARS-CoV-2 и тяжёлого течения COVID-19 существенно превосходит потенциальный риск развития серьёзных НЯ и обострения ИВРЗ. В настоящее время эта позиция полностью совпадает с мнением экспертов как международных, так и национальных ревматологических научных обществ, включая Ассоциацию ревматологов России [15].

Заключение

Согласно предварительным данным, иммунизация пациентов с ИВРЗ комбинированной векторной вакциной Гам-КОВИД-Вак представляется достаточно безопасной. Необходимы дальнейшие исследования для оценки безопасности, а также иммуногенности и клинической эффективности указанной вакцины у больных ИВРЗ.

Дополнительная информация

Прозрачность исследования. Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

Настоящая статья подготовлена в рамках научно-исследовательской работы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», № Государственного задания 1021051503137-7.

5. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S. et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. Lancet. 2021; 397 (10275): 671–681. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
6. Буланов Н.М., Новиков П.И., Гуляев С.В., Смитиенко И.О., Мешков А.Д., Бородин О.О. и др. Переносимость вакцины Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) у взрослых пациентов с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями. Клиническая фармакология и терапия. 2021; 30 (4): 23–28. <https://doi.org/10.32756/0869-5490-2021-4-23-28>. [Bulanov N., Novikov P., Gulyaev S., Smittenko I.O., Meshkov A.D., Borodin O.O. et al. Tolerability and safety of Gam-COVID-Vac (Sputnik V) vaccine in adult patients with autoimmune rheumatic diseases. Klinicheskaya Farmakologiya i Terapiya. 2021; 30 (4): 23–28. <https://doi.org/10.32756/0869-5490-2021-4-23-28>. (in Russian)]
7. Куликов А.Н., Муравьева Н.В., Белов Б.С. Безопасность вакцин против COVID-19 у больных с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями (предварительные данные). Современная ревматология. 2022; 16 (1): 26–31. <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2022-1-26-31>. [Kulikov A.N., Muravyeva N.V., Belov B.S. Safety of COVID-19 vaccines in patients with immunoinflammatory rheumatic diseases (preliminary data). Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal. 2022; 16 (1): 26–31. <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2022-1-26-31>. (in Russian)]

8. Braun-Moscovici Y, Kaplan M, Braun M, Markovits D, Giryes S, Toladano K. *et al.* Disease activity and humoral response in patients with inflammatory rheumatic diseases after two doses of the Pfizer mRNA vaccine against SARS-CoV-2. *Ann Rheum Dis.* 2021; 80 (10): 1317–1321. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-220503.
9. Furer V, Eviatar T, Zisman D, Peleg H, Paran D, Levartovsky D. *et al.* Immunogenicity and safety of the BNT162B2 mRNA COVID-19 vaccine in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases and general population: a multicenter study. *Ann Rheum Dis.* 2021; 80 (10): 1330–1338. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-220647.
10. Sattui S.E., Liew J.W., Kennedy K., Sirotich E., Putman M., Moni T.T. *et al.* Early experience of COVID-19 vaccination in adults with systemic rheumatic diseases: Results from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance Vaccine Survey. *RMD Open.* 2021; 7 (3): e001814. doi: 10.1136/rmdopen-2021-001814.
11. Fragoulis G.E., Bournia V.K., Mavrea E., Evangelatos G., Fragiadaki K., Karamanakos A. *et al.* COVID-19 vaccine safety and nocebo-prone associated hesitancy in patients with systemic rheumatic diseases: A cross-sectional study. *Rheumatol Int.* 2021; 42 (1): 31–39. doi: 10.1007/s00296-021-05039-3.
12. Cherian S., Paul A., Ahmed S., Alias B., Manoj M., Santhosh A.K. *et al.* Safety of the ChAdOx1 nCoV-19 and the BBV152 vaccines in 724 patients with rheumatic diseases: A post-vaccination crosssectional survey. *Rheumatol Int.* 2021; 41 (8): 1441–1445. doi: 10.1007/s00296-021-04917-0.
13. Barbhaiya M., Levine J.M., Bykerk V.P., Jannat-Khah D., Mandl L.A. Systemic rheumatic disease flares after SARS-CoV-2 vaccination among rheumatology outpatients in New York City. *Ann Rheum Dis.* 2021; 80 (10): 1352–1354. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-220732.
14. Izmirly P.M., Kim M.Y., Samanovic M., Fernandez-Ruiz R., Ohana S., Deonaraine K.D. *et al.* Evaluation of immune response and disease status in systemic lupus erythematosus patients following SARS-CoV-2 vaccination. *Arthritis Rheumatol.* 2021; 74 (2): 284–294. doi: 10.1002/art.41937.
15. Насонов Е.Л., Лила А.М., Мазуров В.И., Белов Б.С., Каратеев А.Е., Дубинина Т.В. и др. Коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19) и иммуновоспалительные ревматические заболевания. Рекомендации Общероссийской общественной организации «Ассоциация ревматологов России». Научно-практическая ревматология. 2021; 59 (3): 239–54. <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2021-239-254>. [Nasonov E.L., Lila A.M., Mazurov V.I., Belov B.S., Karateev A.E., Dubinina T.V. *et al.* Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Immune-mediated Rheumatic Diseases. Recommendations of the Association of Rheumatologists of Russia. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2021; 59 (3): 239–54. <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2021-239-254>. (in Russian)].

Информация об авторах

Куликов Александр Николаевич — младший научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-1040-313X. eLIBRARY SPIN-код: 1512-0204. Scopus Author ID: 57207452071

Муравьева Наталья Валерьевна — к. м. н., научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID: 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: 0000-0001-7091-2054. ResearcherID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN-код: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

About the authors

Aleksandr N. Kulikov — Junior Researcher at the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-1040-313X. eLIBRARY SPIN: 1512-0204. Scopus Author ID: 57207452071

Natalia V. Muravyeva — Ph. D. in medicine, V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-4327-6720. Researcher ID: AAF-4853-2021. eLIBRARY SPIN: 8418-4469. Scopus Author ID: 57210263706

Boris S. Belov — D. Sc. in medicine, V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-7091-2054. ResearcherID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

Состояние проблемы коморбидных социально-значимых инфекций в условиях пандемии COVID-19

*В. М. КОЛОМИЕЦ¹, Н. А. ПОЛЬШИКОВА¹, А. Л. КОВАЛЕНКО², Е. П. ПАВЛЕНКО¹

¹ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Курск, Россия

² ФГБУ «Научно-консультативный центр токсикологии им. С.Н. Голикова» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

The Problem of Comorbid Socially Significant Infections Under The Conditions of The COVID-19 Pandemic

*VLADISLAV M. KOLOMIETS¹, NATALIA A. POLSHIKOVA¹,
ALEKSEY L. KOVALENKO², ELIZAVETA P. PAVLENKO¹

¹ Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia

² Scientific Advisory Center of Toxicology named after S. N. Golikov, St. Petersburg, Russia

Резюме

Цель исследования. Анализ особенностей формирования эпидемической ситуации по туберкулёзу (ТБ) в условиях пандемии COVID-19 для прогнозирования дальнейших действий медицинских организаций.

Материалы и методы. Проанализированы данные по региону за последние 5 лет (2017–2021 гг.), включающие в том числе 1762 впервые выявленных случая больных с ТБ и сопутствующей патологией (по данным ОБУЗ «ОКПТД»). Все случаи верифицированы с помощью стандартных методов диагностики, включая молекулярно-генетические для определения устойчивости возбудителей к антибактериальным препаратам.

Результаты. Выявлено, что эпидемиологическая ситуация в регионе носила разнонаправленный характер: так во время эпидемии COVID-19 наиболее выраженное снижение заболеваемости отмечено среди больных гепатитом с хроническим течением (в 16,4 раза), в то время как туберкулёзом — в 2,75 раза, а гепатитами с острым течением процесса — только 1,5 раза ($p < 0,05$). Среди случаев коморбидной инфекции наиболее тяжёлое течение отмечалось у пациентов с сочетанной (ТБ+ВИЧ)-инфекцией: имело место как более тяжёлое общее состояние, так и развитие побочных (нежелательных) реакций на противотуберкулёзные препараты, что требовало расширения терапии сопровождения.

Выводы. Результаты исследования показали, что на фоне пандемии COVID-19 в регионе не выявлено тенденций к ухудшению эпидемической ситуации прежде всего по приоритетной из социально-значимой инфекции — туберкулёзу. При этом отмечен рост численности случаев коморбидной патологии, в том числе — ВИЧ+ТБ. В терапии пациентов с коморбидными формами инфекции необходимо учитывать возможность развития гепатотоксических реакций и как следствие — назначение в терапии сопровождения препаратов с гепатопротекторным и дезинтоксикационным действием.

Ключевые слова: коморбидная инфекция; COVID-19; туберкулёз, ВИЧ-инфекция; ремаксол; гепатотоксичность

Для цитирования: Коломиец В. М., Польшикова Н. А., Коваленко А. Л., Павленко Е. П. Состояние проблемы коморбидных социально-значимых инфекций в условиях пандемии COVID-19. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 7–8: 40–44. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-40-44>.

Abstract

The aim of the study. To analyze formation features of the epidemic situation for tuberculosis (TB) in the context of the COVID-19 pandemic in order to predict the further actions of medical organizations.

Materials and methods. The data for the region for the last 5 years (2017–2021) were analyzed, including 1,762 newly diagnosed cases of patients with TB and comorbidities (according to the data of the Regional Public Health Organization «Regional Clinical Anti-Tuberculosis Dispensary»). All cases were verified using standard diagnostic methods, including molecular genetic methods, to determine the resistance of pathogens to antibacterial drugs.

Results. It was revealed that the epidemiological situation in the region was multidirectional: thus, during the COVID-19 epidemic, the most pronounced incidence decrease was observed among cases of chronic course hepatitis (by 16.4 times), while among patients with tuberculosis the incidence decreased by 2.75 times, and among patients with acute hepatitis — only by 1.5 times ($P < 0.05$). Among the cases of comorbid infection, the most severe course was observed in patients with combined (TB + HIV) infection: there was both a more severe general condition, and the development of adverse (undesirable) reactions to anti-TB drugs, which required an extension of maintenance therapy.

Conclusions. The results of the study showed that against the background of the COVID-19 pandemic in the region, there was no tendency towards a worsening of the epidemic situation, primarily for the more socially significant infection — tuberculosis. At the same time, there was an increase in the number of cases of comorbid pathology, including HIV + TB. In the treatment of

patients with comorbid forms of infection, it is necessary to take into account the possibility of developing hepatotoxic reactions and, as a result, the appointment of accompanying drugs with hepatoprotective and detoxification effects in therapy.

Keywords: *comorbid infection; COVID-19; tuberculosis; HIV infection; remaxol; hepatotoxicity*

For citation: Kolomiets V. M., Polshikova N. A., Kovalenko A. L., Pavlenko E. P. The problem of comorbid socially significant infections under the conditions of the COVID-19 pandemic. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 7–8: 40–44. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-40-44>.

Введение

По данным, опубликованным в Докладе Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) о глобальной борьбе с туберкулёзом (ТБ) 2021 г. [1], пандемия новой коронавирусной инфекции (НКИ, COVID-19) серьёзно повлияла на темпы борьбы с этим заболеванием: впервые за более чем десять лет показатели смертности от туберкулёза увеличились. Кроме того, по сравнению с 2019 г., в 2020 г. в связи с карантинными мерами, отмечено снижение численности людей, прошедших диагностику, лечение или профилактическую терапию туберкулёза на фоне сокращения общих параметров финансирования основных видов противотуберкулёзной помощи в связи с их переориентацией на борьбу с COVID-19. Эксперты ВОЗ, проанализировав эпидемические показатели, отметили, что снижение количества заболевших туберкулёзом не является благоприятным показателем и может стать предпосылкой для повышения смертности на фоне позднего выявления инфекции и объективного снижения числа заболевших лиц [2–4].

В Российской Федерации в период пандемии COVID-19 также отмечено снижение регистрации случаев впервые выявленного ТБ и рецидивов заболевания [5]. При этом отмечается рост доли пациентов с деструктивными изменениями лёгочной ткани, бактериовыделителей и увеличение посмертной диагностики ТБ [6, 7].

Не вызывает сомнений факт возможного сочетания двух инфекционных заболеваний (ТБ и COVID-19) [2, 4, 8–10]. Отмечено, что пациенты с ТБ имеют более высокие риски заражения COVID-19 и неблагоприятного его течения: выздоровление от инфекции затягивается, летальность среди пациентов с коинфекцией (ТБ+COVID-19) выше, чем среди пациентов с COVID-19 в 2,17 раза, при этом временной промежуток до наступления смерти — короче [4, 10].

В данных условиях актуальным является разработка и использование алгоритмов обследования и терапии пациентов с коинфекцией, включающая бактериологические и молекулярно-генетические методы исследования для раннего выделения ДНК микобактерий туберкулёза и определения спектра их лекарственной чувствительности в условиях инфекционного стационара для подбора и назначения адекватной противотуберкулёзной химиотерапии (ПТХ) [1, 7, 11].

Цель исследования — анализ особенностей формирования эпидемической ситуации по туберкулёзу в условиях пандемии COVID-19 для прогнозирования дальнейших действий медицинских организаций.

Материал и методы

Проанализированы официальные статистические данные по региону за последние 5 лет (2017–2021 гг.), включающие в том числе 1762 впервые выявленных случая и больных с ТБ и сопутствующей патологией (по данным ОБУЗ «ОКПТД»). Все случаи верифицированы с помощью стандартных методов диагностики, включая молекулярно-генетические, для определения устойчивости возбудителей к антибактериальным препаратам.

Статистическую обработку результатов проводили по критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010, Statistica 8. Существенность различий оценивали по U -критерию. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Результаты исследования

За период с 2017 по 2021 гг. эпидемиологическая ситуация среди взрослого населения по социально — значимым инфекциям в регионе носила разнонаправленный характер: так, во время пандемии COVID-19 наиболее выраженное снижение заболеваемости отмечено среди случаев гепатита с хроническим течением (в 16,4 раза), в то время как туберкулёзом — в 2,75 раза, а гепатитами с острым течением процесса — только 1,5 раза (рис. 1). При этом заболеваемость ВИЧ изменилась незначительно, что создаёт дополнительные трудности в связи с возможной коморбидностью инфекции, то есть наличием у одного больного нескольких заболеваний. Это сказывается на течении и ухудшении прогноза, оказывает негативное влияние на качество жизни пациента и увеличивает вероятность летального исхода.

Анализ данных по структуре заболеваемости туберкулёзом выявил волнообразную динамику с тенденцией к снижению как моноинфекции, так и коморбидной формы независимо от сопутствующей патологии (рис. 2).

Среди случаев коморбидной инфекции наиболее тяжёлое течение отмечалось у пациентов с ТБ+ВИЧ-инфекцией. У этих пациентов имели место как более тяжёлое общее состояние, так и развитие побочных (нежелательных) реакций на противотуберкулёзные препараты. В связи с этим, схемы

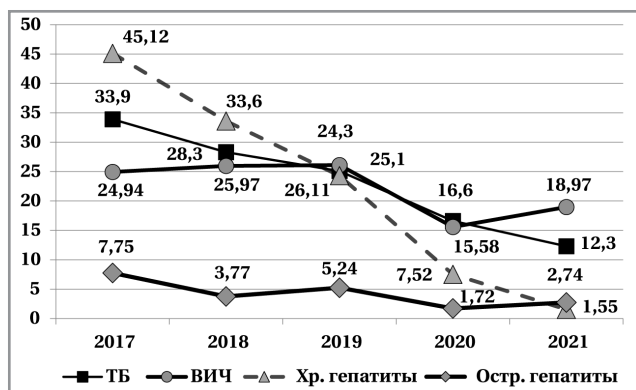


Рис. 1. Показатели заболеваемости (на 100 000 населения) социально-значимых инфекций в регионе в 2017–2021 гг.

Fig. 1. Morbidity rates (per 100,000 population) of socially significant infections in the region in 2017–2021

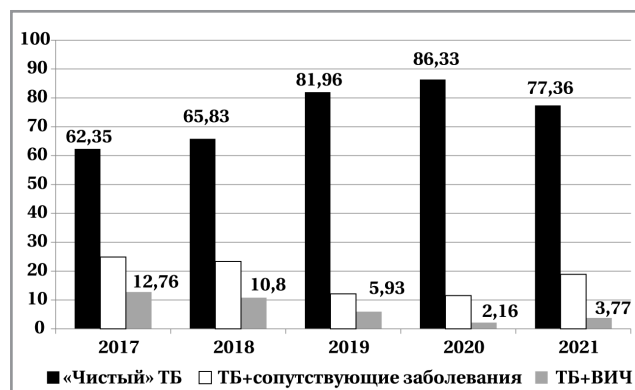


Рис. 2. Структура и динамика заболеваемости ТБ (в %) в регионе до и в период 2017–2021 гг.

Fig. 2. Structure and dynamics of TB incidence (in %) in the region before and during 2017–2021

терапии данных пациентов необходимо дополнять препаратами с гепатопротекторными и детоксикационными свойствами.

В качестве примера приводим собственное **клиническое наблюдение**.

Больной О., 33 года. Из анамнеза жизни известно, что пациент является ВИЧ-инфицированным в течение последних 1,5 лет. Кроме того, с 18 лет болеет хроническим гепатитом С, диагностирована хроническая герпесвирусная инфекция. Перенёс гонорею и трихомониаз. Туберкулёзом ранее не болел.

Больной находился в пеницициарном учреждении в течение 6 мес., когда на фоне стресса появились жалобы на резкое ухудшение общего состояния, нарастающие признаки интоксикации (слабость, вялость, снижение аппетита), появление кашля и боли в межлопаточной области, усиливающиеся при глубоком вдохе. В связи с этим пациент был госпитализирован.

Обследование при поступлении выявило на компьютерной томограмме в проекции преимущественно верхних долей множественные участки деструкции на фоне очагово-инфильтративных изменений ткани лёгких (рис. 3).

Вирусная нагрузка: 37 169 копий РНК. Иммунный статус — СД4 — $0,156 \times 10^9/\text{л}$, СД8 — $0,985 \times 10^9/\text{л}$; СД4/СД8 0,16. Титры антител: CMV IgG — 6 Ед/мл; Herpes Simplex Virus 1/2, IgG — 1:160.

Общий анализ крови: эритроциты — $3,1 \times 10^{12}$, Hb — 90, ЦП — 0,87, лейкоциты — $4,7 \times 10^9$, эозинофилы — 2, пал. ядер. — 5, сегм. — 61, лимф. — 24, моноциты — 8, СОЭ — 61.

Биохимический анализ крови: глюкоза крови — 3,88 ммоль/л; билирубин общий — 8,7 мкмоль/л; АСТ — 36 Ед/л,

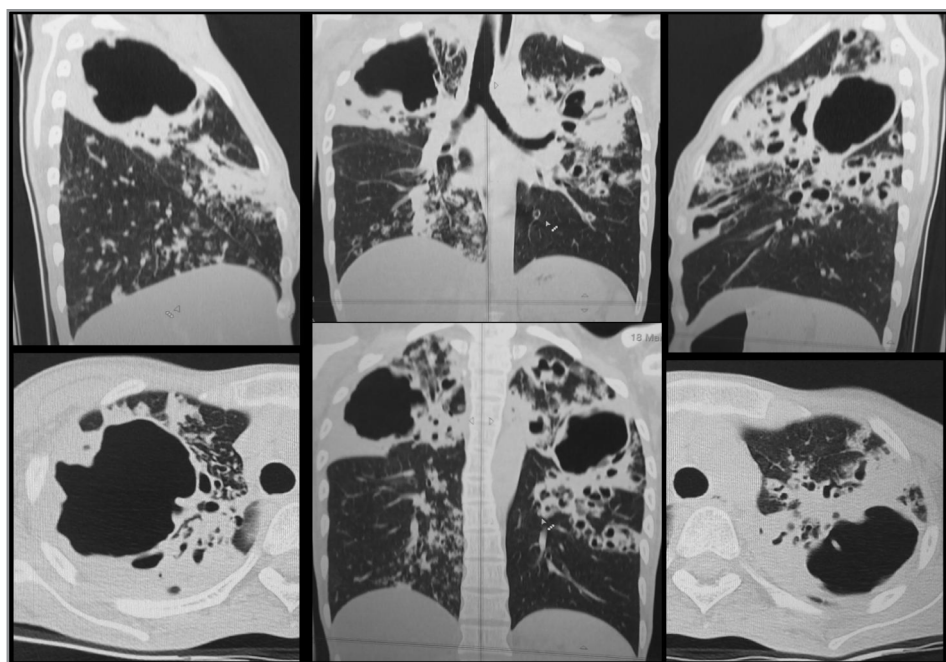


Рис. 3. Данные исследования лучевыми методами (компьютерная томография) лёгких при поступлении.

В проекции преимущественно верхних долей множественные участки деструкции на фоне очагово-инфильтративных изменений.

Fig. 3. Data from the study using radiation methods (computed tomography) of the lungs at admission.

There are mainly multiple areas of destruction against the background of focal infiltrative changes in the projection of the upper lobes.

АЛТ — 32 Ед/л, холестерин — 2,85 ммоль/л, мочевина — 4,30 ммоль/л, общий белок — 63,92 г/л, тимоловая проба — 5 ед.

Бактериологическое обследование: в мокроте методом микроскопии были выявлены *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) — до 5 в поле зрения, исследование спектра чувствительности возбудителя выявило устойчивость к стрептомицину. Мазок из носоглотки/ротоглотки методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) на РНК SARS-CoV-2 отрицательный. Общий анализ мочи и кала — без патологических изменений.

По совокупности данных был поставлен диагноз: казеозная пневмония верхних долей лёгких, фаза распада и обсе-

менения, МБТ (+). ВИЧ-инфекция 4 Б стадия. Хронический гепатит С, ЦМВИ.

Было назначена противотуберкулёзная химиотерапия (ПТХ) по I режиму (изониазид + рифамицин + пиразинамид + этамбутол) из расчёта 10 мг/кг массы тела рифампицина; антиретровирусная терапия (АРВТ) 4 препаратами.

На 10-й день основного курса лечения больной стал предъявлять жалобы на выраженный кожный зуд, боли в правом подреберье, отмечены иктеричность кожи и склер. В анализе крови: глюкоза — 2,94 ммоль/л; билирубин — 17,4 мкмоль/л, АСТ — 128,9 Ед/л, АЛТ — 149,2 Ед/л, холестерин — 8,3 ммоль/л, общий белок — 70,7 г/л, тимоловая проба — 6. Состояние было расценено как токсическая реакция на препараты этиотропной терапии.

Временная отмена ПТХ в течение 5 дней не дала эффекта. В связи с этим в схему лечения был включён курс ремаксола: по 400,0 мл в/в, через день, №5, затем в течение одного месяца — один раз в неделю по 400,0 в/в, №4. На фоне введения препарата было отмечено улучшение: уменьшение и исчезновение болевого синдрома и желтушности, нормализация уровня трансаминаз.

В дальнейшем, на фоне комбинированной терапии через 3,5 мес. удалось достичь абациллирования мокроты, снижения выраженности симптомов интоксикации. На КТ лёгких в динамике констатировано уменьшение количества очаговых теней и инфильтративных изменений, однако полости распада сохранялись. В связи с этим и по совокупности клинико-лабораторных и анамнестических данных пациенту в дальнейшем, после окончания основного курса ПТХ, показано хирургическое лечение.

Обсуждение

Таким образом, анализ данных показал, что пандемия COVID-19 не оказала существенного влияния на эпидемиологическую ситуацию по социально-значимым инфекциям в регионе, что может быть связано со своевременной перестройкой и эффективной работой медицинских служб.

На фоне пандемии COVID-19 и введения в связи с этим ограничительных мер отмечен ряд особенностей развития ТБ: уменьшение доли первые выявленных форм и рецидивов инфекции, что привело к росту так называемой «скрытой заболеваемости» и увеличению доли пациентов с деструктивными изменениями в лёгочной ткани и бактериовыделению; сокращение доступа пациентов к ПТХ привело к увеличению доли устойчивых форм болезни (МЛУ/ШЛУ-ТБ). Рядом авторов указывается на возможность активации латентных форм ТБ на фоне COVID-19 и наоборот, пациенты, имеющие остаточные изменения структуры лёгочной ткани после НКИ имеют более высокий риск заражения ТБ [12]. На этом фоне большое значение приобретает коморбидная патология, в частности — ВИЧ+ТБ. Назначение большого

объёма этиотропных препаратов может вызывать развитие гепатотоксических реакций, требующих в свою очередь применения в схеме терапии сопроводения препаратов с гепатопротекторным и дезинтоксикационным действием. Одним из таких препаратов является ремаксол. В состав раствора входят янтарная кислота, N-метилглюкамин (меглюмин), рибоксин (инозин), метионин и никотинамид и ряд вспомогательных электролитов. Ремаксол способствует увеличению скорости анаэробного гликолиза, препятствует отложению в печени молекул нейтральных липидов и является кофактором реакций трансметилирования, необходимых для протекания синтетических процессов в гепатоцитах и восстановления глутатион-зависимых ферментов. Препарат показал свою эффективность как во фтизиатрии [13], так и при лечении пациентов с COVID-19 [14, 15].

Заключение

Результаты исследования показали, что на фоне пандемии COVID-19 в регионе не выявлено тенденций к ухудшению эпидемической ситуации прежде всего по приоритетной из социально-значимой инфекции — туберкулёзу. При этом отмечен рост численности случаев коморбидной патологии, в том числе ВИЧ+ТБ. В терапии пациентов с коморбидными формами инфекции необходимо учитывать возможность развития гепатотоксических реакций и как следствие — необходимость назначения в терапии сопроводения препаратов с гепатопротекторным и дезинтоксикационным действием.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Соответствие принципам этики. Все пациенты и добровольцы, участвовавшие в исследовании, ставшим материалом для настоящей статьи, давали письменное добровольное информированное согласие. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.).

Литература/References

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Mishra A., George A.A., Sahu K.K., Lal A., Abraham G. Tuberculosis and COVID-19 co-infection: An Updated Review. Acta Biomed. 2020 Nov 10; 92 (1): e2021025. doi: 10.23750/abm.v92i1.10738.
3. Song W.M., Zhao G.Y., Zhang Q.Y., Liu S.Y., Zhu X.H., An Q.Q., Xu T.T., Li S.J., Liu J.Y., Tao N.N., Liu Y., Li Y.F., Li H.C. COVID-19 and Tuberculosis Coinfection: An Overview of Case Reports/Case Series and Meta-Analysis.

Front Med (Lausanne). 2021 Aug 24; 8: 657006. doi: 10.3389/fmed.2021.657006. eCollection 2021.

4. Wang Q., Guo S., Wei X., Dong Q., Xu N., Li H., Zhao J., Sun Q. Global prevalence, treatment and outcome of tuberculosis and COVID-19 coinfection: a systematic review and meta-analysis (from November 2019 to March 2021). BMJ Open. 2022. Jun 20; 12 (6): e059396. doi: 10.1136/bmjopen-2021-059396.e059396.
5. Влияние коронавирусной инфекции COVID-19 на ситуацию в Рос- сийском здравоохранении. Аналитический доклад под общей ред. академика РАН В. И. Стародубова. М.: 2020; 45. 5. [Vliyaniye korona-

- virusnoj infektsii COVID-19 na situatsiyu v Rossijskom zdravookhraneni. Analiticheskij doklad pod obshej red. akademika RAN V. I. Starodubova. Moscow: 2020; 45. (in Russian)]
6. *Нечаева О. Б.* Состояние и перспективы противотуберкулёзной службы России в период COVID-19. Туберкулёз и болезни лёгких. 2020; 98 (12): 7–19. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-12-7-19>. [Nechaeva O. B. Sostoyaniye i perspektivy protivotuberkuleznoj sluzhby Rossii v period COVID-19. Tuberkulez i Bolezni Legkikh 2020; 98 (12): 7–19. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-12-7-19>. (in Russian)]
 7. *Русакова Л.И., Кучерявая Д.А., Стерликов С.А.* Оценка влияния пандемии COVID-19 на систему оказания противотуберкулёзной помощи в российской Федерации. Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2021; 2: 553–577. <http://doi.org/10.24412/2312-2935-2021-2-553-577>. [Rusakova L.I., Kucheryavaya D.A., Sterlikov S.A. Otsenka vliyaniya pandemii COVID-19 na sistemu okazaniya protivotuberkuleznoj pomoshchi v rossijskoj Federatsii Sovremennyye Problemy Zdravookhraneniya I Meditsinskoj Statistiki. 2021; 2: 553–577. <http://doi.org/10.24412/2312-2935-2021-2-553-577>. (in Russian)]
 8. *Лебедева И.Б., Осинцева И.Ю., Бондаренко Т.Е., Пьянзова Т.В., Брусина Е.Б.* COVID-19 в популяции больных туберкулёзом: эпидемиологическая и клиническая характеристики. Фундаментальная и клиническая медицина. 2021; 6 (3): 71–84. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2021-6-3-71-84>. [Lebedeva I.B., Osintseva I.Yu., Bondarenko T.E., Pyanzova T.V., Brusina E.B. COVID-19 v populyatsii bol'nykh tuberkulezom: epidemiologicheskaya i klinicheskaya kharakteristiki Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina. 2021; 6 (3): 71–84. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2021-6-3-71-84>. (in Russian)]
 9. *Стерликов С.А., Сон И.М., Саенко С.С., Русакова Л.И., Галкин В.Б.* Возможное влияние пандемии COVID-19 на эпидемическую ситуацию по туберкулёзу. Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2020; 2: 191–205. <http://doi.org/10.24411/2312-2935-2020-00042>. [Sterlikov S.A., Son I.M., Saenko S.S., Rusakova L.I., Galkin V.B. Vozможное vliyaniye pandemii COVID-19 na epidemicheskuyu situatsiyu po tuberkulezu Sovremennyye Problemy Zdravookhraneniya I Meditsinskoj Statistiki. 2020; 2: 191–205 <http://doi.org/10.24411/2312-2935-2020-00042>. (in Russian)]
 10. *Савинцева Е. В., Исаева П. В., Низамов Г. Ф.* Туберкулёз и COVID-19: медицинские и социальные аспекты. Туберкулёз и болезни лёгких. 2022; 100 (3): 13–17. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-3-13-17>. [Savintseva E. V., Isaeva P. V., Nizamov G. F. Tuberkulez i COVID-19: meditsinskie i sotsial'nye aspekty Tuberkulez i Bolezni Legkikh. 2022; 100 (3): 13–17. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-3-13-17>. (in Russian)]
 11. *Барышников Л. А., Кабаева М. Н., Воекова Н. А., Логинова Н. А., Сиротко И. И.* Организация деятельности противотуберкулёзных медицинских учреждений в условиях пандемии COVID-19. Туберкулёз и болезни лёгких. 2021; 99 (3): 12–17. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-3-12-1>. [Baryshnikova L. A., Kabaeva M. N., Voekova N. A., Loginova N. A., Sirotko I. I. Organizatsiya deyatel'nosti protivotuberkuleznykh meditsinskikh uchrezhdenij v usloviyakh pandemii COVID-19 Tuberkulez i Bolezni Legkikh. 2021; 99 (3): 12–17. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-3-12-1>. (in Russian)]
 12. *Стерликов С.А., Михайлова Ю.В., Пономарёв С.Б.* Туберкулёз в пенитенциарных учреждениях Российской Федерации по сравнению со странами европейского региона ВОЗ и мира на рубеже третьего десятилетия XXI века. Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2021; 4: 515–532. <http://doi.org/10.24412/2312-2935-2021-4-515-532>. [Sterlikov S.A., Mikhailova Yu.V., Ponomarev S.B. Tuberkulez v penitentsiarnykh uchrezhdeniyakh Rossijskoj Federatsii po sravneniyu so stranami evropejskogo regiona VOZ i mira na rubezhe tret'ego desyatiletiya XXI veka Sovremennyye Problemy Zdravookhraneniya I Meditsinskoj Statistiki. 2021; 4: 515–532. <http://doi.org/10.24412/2312-2935-2021-4-515-532>. (in Russian)]
 13. *Баласанянц Г.С.* Гепатотоксические реакции и гепатопротективная терапия во фтизиатрии. Туберкулёз и болезни лёгких. 2015; 8: 48–52. [Balasanyants G.S. Gepatotoksicheskie reaksii i gepatoprotektivnaya terapiya vo ftiziatrii Tuberkulez i bolezni legkikh 2015; 8: 48–52. (in Russian)]
 14. *Иванова М. И., Иванов В. М., Щеглова Ю. М., Коваленко А. Л., Таликова Е. В.* Медицинская реабилитация больных пожилого и старческого возраста с пневмонией, ассоциированной с коронавирусной инфекцией COVID-19. Антибиотики и химиотер. 2022; 67 (3–4): 36–41. <http://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-3-4-36-41>. [Ivanova M. I., Ivanov V. M., Shcheglova Yu. M., Kovalenko A. L., Talikova E. V. Meditsinskaya rehabilitatsiya bol'nykh pozhilogo i starcheskogo vozrasta s pnevmoniej, assotsirovannoj s koronavirusnoj infektsiej COVID-19 Antibiotiki i Khimioter. 2022; 67 (3–4): 36–41. <http://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-3-4-36-41>. (in Russian)]
 15. *Шовкун Л. А., Кудлай Д. А., Кампос Е. Д., Николенко Н. Ю., Шлык И. Ф., Сарычев А. М.* Возможности патогенетической терапии при лечении новой коронавирусной инфекции COVID-19. Туберкулёз и болезни лёгких. 2022; 100 (6): 46–52. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-6-46-52>. [Shovkun L. A., Kudlay D. A., Kampos E. D., Nikolenko N. Yu., Shlyk I. E., Sarychev A. M. Vozможnosti patogeneticheskoy terapii pri lechenii novoj koronavirusnoj infektsii COVID-19 Tuberkulez i Bolezni Legkikh. 2022; 100 (6): 46–52. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2022-100-6-46-52>. (in Russian)]

Информация об авторах

Коломиец Владислав Михайлович — д. м. н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Курск, Россия

Польшикова Наталья Александровна — ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Курск, Россия

Коваленко Алексей Леонидович — д. б. н., к. х. н., дважды лауреат Государственной премии в области науки и техники, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства им. С. Н. Голикова», Санкт-Петербург, Россия

Павленко Елизавета Петровна — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Курск, Россия

About the authors

Vladislav M. Kolomiets — D. Sc. in medicine, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia

Natalia A. Polshikova – Assistant at the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia

Aleksey L. Kovalenko — D. Sc. in biology, Ph. D. in chemistry, two-time winner of the State Prize in the field of science and technology, Scientific Advisory Center of Toxicology named after S. N. Golikov, St. Petersburg, Russia

Elizaveta P. Pavlenko — Assistant at the Department of Clinical Immunology, Allergology, and Phthysipulmonology, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia

Влияние носительства полиморфных вариантов *CYP3A5*3* и *CYP3A4*22* на безопасность терапии ремдесивиром у пациентов с COVID-19

*И. И. ТЕМИРБУЛАТОВ^{1,2}, А. В. КРЮКОВ^{1,2}, К. Б. МИРЗАЕВ¹,
Н. П. ДЕНИСЕНКО¹, Ш. П. АБДУЛЛАЕВ¹, А. С. ЖИРЯКОВА¹, Ю. В. ШЕВЧУК¹,
В. И. ВЕЧОРКО², О. В. АВЕРКОВ², Д. А. СЫЧЕВ¹

¹ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ, Москва, Россия

² Городская клиническая больница № 15 им. О. М. Филатова ДЗМ 111539, Москва, Россия

The Effect of Carriage of *CYP3A5*3* and *CYP3A4*22* Polymorphic Variants on the Safety of Remdesivir Therapy in Patients with COVID-19

*ILYAS I. TEMIRBULATOV^{1,2}, ALEXANDER V. KRYUKOV^{1,2}, KARIN B. MIRZAEV¹,
NATALYA P. DENISENKO¹, SHERZOD P. ABDULLAEV¹, ANNA S. ZHIRYAKOVA¹,
YULIYA V. SHEVCHUK¹, VALERY I. VECHORKO², OLEG V. AVERKOV², DMITRY A. SYCHEV¹

¹ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

² Filatov City Clinical Hospital No. 15, Moscow, Russia

Резюме

Цель исследования — оценить ассоциации полиморфных вариантов *CYP3A5*3* 6986 A > G rs776746 и *CYP3A4*22* rs35599367 C > T с параметрами безопасности терапии ремдесивиром у пациентов с COVID-19.

Материал и методы. В исследование было включено 156 пациентов, госпитализированных в ГКБ №15 ДЗМ с диагнозом COVID-19, получавших ремдесивир в качестве противовирусного препарата. Частота побочных реакций (брадикардии, диспепсические расстройства), а также различные лабораторные параметры (уровни АЛТ, АСТ, креатинина, ферритина, интерлейкина-6 и д-димера) сравнивались между носителями «дикого» и полиморфных вариантов изучаемых генов.

Результаты. У носителей полиморфных вариантов *CYP3A5*3* (GA+AA) уровень АЛТ после терапии ремдесивиром был выше, чем у носителей дикого варианта (GG). При сравнении уровня интерлейкина-6 после терапии ремдесивиром носители полиморфного варианта *CYP3A4*22* (CT) гена имели достоверно больший показатель этого цитокина.

Заключение. Выявили ассоциацию носительства полиморфных вариантов *CYP3A5*3* с повышением уровня печеночных ферментов. Полиморфные варианты *CYP3A4*22* ассоциировались с более высокими уровнями интерлейкина-6. Для оценки возможностей персонализации противовирусной терапии COVID-19 требуются дополнительные фармакогенетические исследования.

Ключевые слова: полиморфные варианты генов; носительство; безопасность терапии; ремдесивир

Для цитирования: Темирбулатов И. И., Крюков А. В., Мирзаев К. Б., Денисенко Н. П., Абдуллаев Ш. П., Жирякова А. С., Шевчук Ю. В., Вечорко В. И., Аверков О. В., Сычев Д. А. Влияние носительства полиморфных вариантов *CYP3A5*3* и *CYP3A4*22* на безопасность терапии ремдесивиром у пациентов с COVID-19. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 7–8: 45–50. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-45-50>.

Abstract

The aim of the study was to assess the association of polymorphic variants *CYP3A5*3* 6986 A>G rs776746 and *CYP3A4*22* rs35599367 C>T with the safety parameters of remdesivir therapy in patients with COVID-19.

Material and methods. The study included 156 patients admitted to the City Clinical Hospital No. 15 of the Moscow Health Department with COVID-19 diagnosis, who received remdesivir as an antiviral drug. The frequency of adverse reactions (bradycardia, dyspeptic disorders), as well as various laboratory parameters (ALT, AST, creatinine, ferritin, interleukin-6, and d-dimer levels) were compared between the carriers of wild-type and polymorphic variants of the studied genes.

Results. Carriers of *CYP3A5*3* polymorphic variants (GA+AA) had higher ALT levels after the treatment with remdesivir than carriers of the wild variant (GG). When comparing the level of interleukin-6 after therapy with remdesivir, carriers of the polymorphic variant of the *CYP3A4*22* (CT) gene had a significantly higher level of this cytokine.

Conclusion. An association between the carriage of polymorphic variants of *CYP3A5*3* and an increase in the level of liver enzymes was found. Polymorphic variants of *CYP3A4*22* were associated with higher levels of interleukin-6. Additional pharmacogenetic studies are required to assess the possibilities of personalizing antiviral therapy for COVID-19.

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: ул. Баррикадная, д. 2/1,
стр. 1, РМАНПО, г. Москва, Россия, 125993.
E-mail: temirbulatov.ilyas@gmail.com

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 2/1, building 1 Barricadnaya st.,
RMACPE, Moscow, 125993 Russia.
E-mail: temirbulatov.ilyas@gmail.com

Keywords: *polymorphic gene variants; carriage; therapy safety; remdesivir*

For citation: Temirbulatov I. I., Kryukov A. V., Mirzaev K. B., Denisenko N. P., Abdullaev Sh. P., Zhiryakova A. S., Shevchuk Yu. V., Vechorko V. I., Averkova O. V., Sychev D. A. The effect of carriage of CYP3A5*3 and CYP3A4*22 polymorphic variants on the safety of remdesivir therapy in patients with COVID-19. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 7–8: 45–50. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-45-50>.

Ремдесивир — пролекарство аналога аденозина, который связывается с вирусной РНК-зависимой РНК полимеразой. Встраивание активного трифосфатного метаболита в вирусную РНК приводит к нарушению репликации вируса [1]. После начала пандемии COVID-19 препарат начал изучаться для лечения нового заболевания. Сначала была показана его активность *in vitro* против SARS-CoV-2 [2]. Затем эффективность препарата была проверена в клинических исследованиях. По результатам рандомизированного плацебо-контролируемого исследования обнаружено, что пациенты в группе ремдесивира быстрее выздоравливали и имели больше шансов на клиническое улучшение на 15-й день [3]. Позже было показано отсутствие значимой разницы в клинических исходах пациентов получавших 10- и 5-дневные курсы ремдесивира [4].

Наиболее частыми побочными реакциями при применении ремдесивира были повышение уровня АЛТ, АСТ, билирубина; нарушение функции почек, а также нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы (гипотензии, брадикардии, остановки сердца) [5].

Согласно досье Европейского Медицинского Агентства, в *in vitro* исследованиях было показано, что ремдесивир является субстратом CYP3A4, хотя компания производитель указывает, что его метаболизм, вероятно, преимущественно опосредован гидролизной активностью [6].

In silico исследования также предсказывают важную роль CYP3A4 в метаболизме ремдесивира (GS-5734) до промежуточного метаболита GS-704277 [7].

Субсемейство CYP3A (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 и CYP3A43) располагаются на 7-й хромосоме и участвуют в метаболизме большого количества ксенобиотиков. CYP3A5 и CYP3A4 на 85% гомологичны и имеют схожую аффинность субстратов. Хотя некоторые препараты, такие как такролимус и мидазолам, имеют большую аффинность к CYP3A5 [8].

Наиболее распространённый среди вариантов CYP3A5 — аллель CYP3A5*3 — характеризуется изменением в 3 интроне, которое ведёт к aberrации сплайсинга и нарушению синтеза фермента. Его частота разнится от 0,12–0,35 среди африканцев до 0,88–0,97 среди европейцев [8]. Также рекомендации CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) содержат инструкцию по подбору стартовой дозы такролимуса в зависимости от носительства аллельных вариантов CYP3A5 [9].

CYP3A4*22 характеризуется заменой C>T в 6 интроне (rs35599367), что приводит к значительному снижению экспрессии м-РНК с CYP3A4. Частота полиморфизма составляет 0,08 среди европейцев и 0,04 среди населения Азии и Африки [8]. Полиморфизмы данного гена ассоциировались со снижением клиренса такролимуса и циклоспорина А у пациентов с трансплантированной почкой [10, 11]. В другом исследовании среди пациентов, получавших статиноtherпию, носительство CYP3A4*1/*22 ассоциировалось с меньшей дозой препарата [12, 13].

Важная роль данных ферментов в метаболизме ремдесивира может открывать возможности для персонализации терапии COVID-19. Ранее фармакогенетические исследования ремдесивира не проводились.

Цель исследования — оценить влияние носительства полиморфных вариантов CYP3A5*3 и CYP3A4*22 на безопасность терапии ремдесивиром.

Материал и методы

Исследование проводилось на базе Городской клинической больницы №15 им. О. М. Филатова Департамента здравоохранения Москвы. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (Протокол №15 от 16.10.21).

Критерием включения были: установленный диагноз коронавирусной инфекции (U07.1; U07.2 по МКБ) и использование ремдесивира в качестве этиотропной терапии, а также подписанное добровольное информированное согласие. Критериями исключения были: противопоказания к назначению ремдесивира (СКФ меньше 30 мл/мин/1,73 м², беременность, период грудного вскармливания, повышение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) свыше 5 верхних границ нормы, тяжёлая печёночная недостаточность (класс С по Чайлд-Пью). Ремдесивир использовался в стандартной дозировке: 200 мг в/в в первые сутки, затем 100 мг один раз в сутки в течение 5–10 дней. Исследователь не мог влиять на выбор противовирусного препарата и длительность терапии.

Во время госпитализации от всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Также было взято 10 мл венозной крови для последующего генотипирования. Генотипирование проводилось на базе НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России. Определение носительства однонуклеотидного полиморфизма C>T гена CYP3A4*22 (rs35599367) проводилось методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX96 Touch Real Time System с ПО CFX Manager версии 3.0 (BioRad, США) с использованием коммерческого набора «TaqMan® SNP Genotyping Assays» и TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, США). Носительство полиморфного маркера A>G гена CYP3A5*3 (rs776746) определялось с помощью коммерческого набора реагентов (ООО «Синтол», Россия). Определение однонуклеотидных генетических полиморфизмов

Таблица 1. Влияние полиморфных вариантов *CYP3A5*3* на частоту нежелательных явлений при приёме ремдесивира**Table 1.** The effect of *CYP3A5*3* polymorphic variants on the incidence of adverse events with remdesivir

НЯ	CYP3A5*3 6986 A>G rs776746				p	ОШ	(95% ДИ)
	GG (n=130)		GA+AA (n=130)				
	абс.	%	абс.	%			
Брадикардия	42	32,3	11	45,8	0,244	0,564	0,233–1,364
Тошнота	4	3,1	0	0	1		
Рвота	1	0,8	0	0	1		
Диарея	10	7,7	2	8,3	1	0,917	0,188–4,472

Таблица 2. Влияние полиморфных вариантов *CYP3A4*22* на частоту нежелательных явлений при приёме ремдесивира**Table 2.** The effect of *CYP3A4*22* polymorphic variants on the incidence of adverse events with remdesivir

НЯ	CYP3A4*22 rs35599367 C>T				p	ОШ	(95% ДИ)
	CC (n=147)		CT (n=7)				
	абс.	%	абс.	%			
Брадикардия	53	36,1	0	0	0,096		
Тошнота	4	2,7	0	0	1		
Рвота	1	0,7	0	0	1		
Диарея	12	8,2	0	0	1		

Таблица 3. Клинико-лабораторные параметры пациентов до начала терапии ремдесивиром в зависимости от носительства вариантов *CYP3A5*3***Table 3.** Clinical and laboratory parameters of patients before the start of remdesivir therapy depending on the carriage of *CYP3A5*3* variants

Параметры	CYP3A5*3 6986 A>G rs776746				p
	GG (n=130)		GA+AA (n=24)		
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
АЛТ (ЕД/л)	26	17-40	27	21-49	0,511
АСТ (ЕД/л)	40	28-52	57	38-73	0,010
Интерлейкин-6 (пг/мл)	49	23-126	24	8-61	0,043
Ферритин (мг/моль)	609	342-757	647	403-763	0,567
Д-димер (нг/мл)	1091	521-1686	1182	585-3379	0,423
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	6.4	4,8-9,2	6.6	4,7-11	0,591
Лимфоциты (10 ⁹ /л)	1	0,7-1,4	1	0,75-1,35	0,976
ЧСС (уд/мин)	85	78-94	88	79-93	0,788

проводилось методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX96 Touch Real Time System с ПО CFX Manager версии 3.0 (BioRad, США).

Пациенты были разделены на две группы: носители «дикого» типа (кодирующие нормально функционирующий фермент) и носители полиморфной аллели в гомо- или гетерозиготном состоянии. Так, для варианта *CYP3A5*3* (rs35599367) параметры сравнивались между носителями вариантов *GG* и *GA+AA*, а для варианта *CYP3A4*22* (rs35599367) — между *CC* и *CT+TT*.

В результате ретроспективного анализа истории болезни отмечалась частота побочных реакций на фоне применения ремдесивира: диспептических расстройств (тошнота, рвота, диарея) и брадикардий (которые определялись как снижение ЧСС менее 60 ударов в минуту). Также оценивались различные лабораторные параметры (уровни АЛТ, АСТ, интерлейкина, ферритина, д-димера, лейкоцитов и лимфоцитов). Данные параметры оценивались дважды: до начала и после окончания курса терапии.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась в программе SPSS Statistics 22.0. Учитывая ненормальное распределение количественных параметров для сравнения использовался тест Манна–Уитни. Сравнение категориальных переменных проводилось при помощи критерия хи-квадрат Пирсона или двустороннего точного критерия Фишера. Для определения достоверности различий между параметрами использовалась величина $p < 0,05$. Расчёт равновесия Харди–Вайнберга проводился с помощью онлайн-инструмента OEGE, применяемый метод — точный критерий Фишера.

Результаты и обсуждение

В исследование было включено 154 пациента, из них 96 женщин (62,3%). Средний возраст со-

ставлял $72,06 \pm 13,5$ года. Носителями варианта *GG* по гену *CYP3A5*3* были 130 пациентов, гетерозиготного варианта *GA* — 23 и один пациент — *AA*. Распределение аллелей соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($p = 0,987$). Для гена *CYP3A4*22* носителями «дикого» варианта *CC* было 147 пациентов, гетерозигот *CT* — 7. Распределение аллелей значимо не отличалось от равновесия Харди–Вайнберга ($p = 0,77$).

Частота брадикардий, тошноты, рвоты и диареи значимо не отличались между носителями полиморфного и «дикого» вариантов обоих изучаемых генов (табл. 1, 2).

До начала терапии уровень АСТ был достоверно выше у носителей полиморфного варианта *CYP3A5*3*. Уровень интерлейкина-6, напротив, был выше у носителей «дикого варианта». Другие лабораторные параметры в изучаемых группах не отличались до начала терапии ремдесивиром (табл. 3, 4).

После проведённой терапии носители полиморфных аллелей (*GA+AA*) гена *CYP3A5*3* имели достоверно больший уровень АСТ: 65 (43–81) против 35 (27–52) у носителей варианта *GG* ($p = 0,001$). Уровень АЛТ был также выше у носителей полиморфных аллелей: 65 (43–81) против 35 (27–52) ($p = 0,001$) (табл. 5). При сравнении

Таблица 4. Клинико-лабораторные параметры пациентов до начала терапии ремдесивиром в зависимости от носительства вариантов CYP3A4*22

Table 4. Clinical and laboratory parameters of patients before the start of remdesivir therapy depending on the carriage of CYP3A4*22 variants

Параметры	CYP3A4*22 rs35599367 C>T				p
	CC (n=147)		CT (n=7)		
	Me	Me	Me	Me	
АЛТ (ЕД/л)	26	17–40	37	21–69	0,204
АСТ (ЕД/л)	40	29–56	45	37–80	0,205
Интерлейкин-6 (пг/мл)	46	20–122	104	30–223	0,575
Ферритин (мг/моль)	606	357–757	766	602–1053	0,129
Д-димер (нг/мл)	1086	517–1729	1264	1172–1323	0,418
ЧСС (уд/мин)	86	78–94	85	79–88	0,768
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	6.6	4,8–9,2	5,7	5,2–6,5	0,658
Лимфоциты (10 ⁹ /л)	1	0,7–1,4	0,95	0,6–1,6	0,902

Таблица 5. Клинико-лабораторные параметры пациентов после терапии ремдесивиром в зависимости от носительства вариантов CYP3A5*3

Table 5. Clinical and laboratory parameters of patients after remdesivir therapy depending on the carriage of CYP3A5*3 variants

Параметры	CYP3A5*3 6986 A>G rs776746				p
	GG (n=130)		GA+AA (n=24)		
	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3	
АЛТ (ЕД/л)	40	27–68	60	42–95	0,008
АСТ (ЕД/л)	35	27–52	65	43–81	0,001
Интерлейкин-6 (пг/мл)	88	20–296	52	1,7–219	0,275
Ферритин (мг/моль)	699	391–1073	754	528–1298	0,320
Д-димер (нг/мл)	1282	503–2327	1548	588–3180	0,452
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	8,1	5,9–12	9,2	6–15	0,373
Лимфоциты (10 ⁹ /л)	1,1	0,7–1,6	0,95	0,68–1,6	0,630
ЧСС после (уд/мин)	64	59–70	61	57–68	0,237
Дельта ЧСС	22	12–29	26	19–32	0,167

Таблица 6. Клинико-лабораторные параметры пациентов после терапии ремдесивиром в зависимости от носительства вариантов CYP3A5*22

Table 6. Clinical and laboratory parameters of patients after remdesivir therapy depending on the carriage of CYP3A5*22 variants

Параметры	CYP3A4*22 rs35599367 C>T				p
	CC (n=147)		CT (n=7)		
	Me	Me	Me	Me	
АЛТ после терапии (ЕД/л)	42	27–74	51	30–71	0,747
АСТ после терапии (ЕД/л)	40	28–57	29	27–53	0,836
Интерлейкин-6 после (пг/мл)	71	17–254	299	174–631	0,039
Ферритин после(мг/моль)	688	409–1072	759	566–1205	0,486
Д-димер после (нг/мл)	1323	514–2406	1389	1129–1954	0,931
ЧСС после (уд/мин)	64	59–70	64	63–68	0,599
Дельта ЧСС после	23	15–30	21	8–25	0,532
Лейкоциты после (10 ⁹ /л)	8,1	5,8–12	14	8,1–17	0,115
Лимфоциты после(10 ⁹ /л)	1,1	0,68–1,6	1,1	0,85–1,5	0,726

уровня интерлейкина-6 после терапии ремдесивиром носители полиморфного варианта (СТ) гена CYP3A4*22 имели достоверно больший показатель этого цитокина: 71 (17–254) (пг/мл) против 299 (174–663) (пг/мл) ($p=0,039$) (табл. 6).

Обсуждение

Повышение печёночных ферментов отмечаются в среднем у 15% пациентов с COVID-19. Это может быть обусловлено как прямым цитотоксическим действием вируса и сопутствующей иммуно-воспалительной реакцией организма, так и гепатотоксическим эффектом препаратов, применяемых для лечения короновиральной ин-

фекции [14]. Так, повышение АЛТ и АСТ является самым частым побочным явлением при терапии ремдесивиром [5]. При этом некоторые авторы отмечают ассоциацию использования ремдесивира с повышением именно АЛТ, но не АСТ [15]. В нашем исследовании мы обнаружили, что в группе носителей полиморфных аллелей CYP3A5*3 уровни АЛТ и АСТ были достоверно выше. При этом уровень АСТ был выше в данной группе и до начала терапии. Таким образом, можно сделать вывод об ассоциации полиморфных вариантов CYP3A5*3 с повышением только АЛТ. Также следует отметить, что повышение печёночных ферментов, обнаруженных нами в исследовании, вряд ли можно назвать клинически значимым. Медианное значе-

ние АЛТ у носителей полиморфных вариантов после терапии составляло 65 ЕД/л, при референсном значении 32 ЕД/л.

Мы не выявили ассоциации вариантов изучаемых генов с побочными реакциями на терапию ремдесивиром. Однако обращает внимание, что среди носителей варианта СТ *CYP3A4*22* не отмечалось брадикардий, хотя эта побочная реакция фиксировалась почти у трети пациентов, включённых в исследование. Возможно, это связано с малым количеством носителей данного варианта ($n=7$).

Мы также обнаружили ассоциацию носительства полиморфных аллелей *CYP3A4*22* с повышенным уровнем интерлейкина-6. Этот маркер часто используется для диагностики «цитокинового шторма», а препараты блокирующие интерлейкин-6 (например, тоцилизумаб) используются для терапии тяжёлого течения коронавирусной инфекции, связанного с этим состоянием [16]. При этом ремдесивир является прямым противовирусным средством, не влияющий напрямую на «цитокиновый шторм» и иммунную реакцию организма пациента. Поэтому, вероятно, эта находка является случайной и также связана с малым числом носителей данного варианта в исследуемой популяции ($n=7$).

Литература/References

- Agostini M.L., Andres E.L., Sims A.C. et al. Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease. *MBio*. 2018; 9 (2): e00221–18. doi: 10.1128/mBio.00221-18.
- Wang M., Cao R., Zhang L. et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*. 2020; 30 (3): 269–271. doi: 10.1038/s41422-020-0282-0
- Beigel J.H., Tomashek K.M., Dodd L.E. et al. Remdesivir for the Treatment of COVID-19 — Final Report. *N Engl J Med*. 2020; 383 (19): 1813–1826. doi:10.1056/NEJMoa2007764.
- Goldman J.D., Lye D.C.B., Hui D.S. et al. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe COVID-19. *N Engl J Med*. 2020; 383 (19): 1827–1837. doi:10.1056/nejmoa2015301.
- Безопасность применения ремдесивира и тоцилизумаба при лечении COVID-19. Безопасность и риск фармакотерапии. 2020; 8 (3): 160–162. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-3-160-162>. [Safety of Remdesivir and Tocilizumab in COVID-19 Treatment. Safety and Risk of Pharmacotherapy. 2020; 8 (3): 160–162. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2020-8-3-160-162>. (in Russian)]
- European Medicines Agency Summary on Compassionate Use of Remdesivir. [(accessed on 15 March 2021)]; Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/summary-compassionate-use-remdesivir-gilead_en.pdf
- Deb S., Reeves A.A. Simulation of remdesivir disposition and its drug interactions. *J Pharm Pharm Sci*. 2021; 24: 277–291. doi: 10.18433/jpps32011.
- Werk A.N., Cascorbi I. Functional gene variants of *CYP3A4*. *Clin Pharmacol Ther*. 2014; 96 (3): 340–348. doi:10.1038/clpt.2014.129.

Информация об авторах

Темирбулатов Ильяс Ильдарович — аспирант кафедры клинической фармакологии и терапии им. Б. Е. Вотчала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; врач клинический фармаколог ГБУЗ «ГКБ № 15 им. О. М. Филатова ДЗМ», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-1242-0833

Крюков Александр Валерьевич — к. м. н., доцент кафедры клинической фармакологии и терапии им. Б. Е. Вотчала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ; заведующий отделением клинической фармакологии, врач клинический фарма-

Заключение

Мы выявили ассоциацию носительства полиморфных вариантов *CYP3A5*3* с повышением уровня печёночных ферментов. Полиморфные варианты *CYP3A4*22* ассоциировались с более высокими уровнями интерлейкина-6. Клиническое значение выявленных ассоциаций остаётся спорным. Для оценки возможностей персонализации противовирусной терапии COVID-19 требуются дополнительные исследования генов других ферментов, участвующих в метаболизме ремдесивира.

Дополнительная информация

Финансирование. Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках государственного задания «Разработка системы поддержки принятия врачебных решений для прогнозирования нежелательных лекарственных реакций у пациентов с COVID-19 на основе фармакогенетического тестирования» (ЕГИСУ НИОКТР №122021800321-2).

- Birdwell K.A., Decker B., Barbarino J.M. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for *CYP3A5* genotype and tacrolimus dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2015; 98 (1): 19–24. doi:10.1002/cpt.113.
- Moes D.J.A.R., Swen J.J., Den Hartigh J. et al. Effect of *CYP3A4*22*, *CYP3A5*3*, and *CYP3A* combined genotypes on cyclosporine, everolimus, and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplantation. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2014; 3 (2): e100. doi:10.1038/psp.2013.78.
- Lunde L., Bremer S., Midtvedt K. et al. The influence of *CYP3A*, *PPARA*, and *POR* genetic variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2014; 70 (6): 685–693. doi:10.1007/s00228-014-1656-3.
- Kitzmiller J.P., Sullivan D.M., Phelps M.A., Wang D., Sadee W. *CYP3A4/5* combined genotype analysis for predicting statin dose requirement for optimal lipid control. *Drug Metabol Drug Interact*. 2013; 28 (1): 59–63. doi:10.1515/dmd-2012-0031.
- Elens L., Becker M.L., Haufroid V. et al. Novel *CYP3A4* intron 6 single nucleotide polymorphism is associated with simvastatin-mediated cholesterol reduction in the Rotterdam Study. *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21 (12): 861–866. doi:10.1097/FPC.0b013e32834c6edb.
- Moon A.M., Barritt A.S. Elevated Liver Enzymes in Patients with COVID-19: Look, but Not Too Hard. *Dig Dis Sci*. 2021; 66 (6): 1767–1769. doi:10.1007/s10620-020-06585-9.
- Kalligeros M., Shehadeh E., Mylonas E., Wands J.R., Mylonakis E. Poster Abstracts. *Hepatology*. 2021; 74 (S1):157–1288. doi:10.1002/hep.32188.
- Majidpoor J., Mortezaee K. Interleukin-6 in SARS-CoV-2 induced disease: Interactions and therapeutic applications. *Biomed Pharmacother*. 2022; 145: 112419. doi:10.1016/J.BIOPHA.2021.112419.

About the authors

Ilyas I. Temirbulatov — Postgraduate student of the Department of Clinical Pharmacology and Therapy named after Academician B. E. Votchal, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-1242-0833

Alexander V. Kryukov — Ph. D. in medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-7903-2977

колог ГБУЗ «ГКБ № 15 им. О. М. Филатова ДЗМ», Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-7903-2977

Мирзаев Карин Бадавиевич — д. м. н., проректор по научной работе и инновациям РМАНПО Минздрава России; директор НИИ молекулярной и персонализированной медицины, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9307-4994

Денисенко Наталья Павловна — к. м. н., заместитель директора НИИ молекулярной и персонализированной медицины, доцент кафедры клинической фармакологии и терапии им. академика Б. Е. Вотчала, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России. ORCID: 0000-0003-3278-5941

Абдуллаев Шерзод Пардабоевич — к. б. н., заведующий отделом предиктивных и прогностических биомаркеров НИИ молекулярной и персонализированной медицины, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9001-1499

Жирыкова Анна Сергеевна — аспирант кафедры клинической фармакологии и терапии им. Б. Е. Вотчала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-4192-654X

Шевчук Юлия Викторовна — аспирант кафедры клинической фармакологии и терапии им. Б. Е. Вотчала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Россия

Вечорко Валерий Иванович — д. м. н., главный врач, Городская клиническая больница № 15 им. О. М. Филатова, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3568-5065

Аверков Олег Валерьевич — д. м. н., профессор, заместитель главного врача, руководитель регионального сосудистого центра, Городская клиническая больница № 15 им. О. М. Филатова, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-3010-755X

Сычёв Дмитрий Алексеевич — д. м. н., профессор, академик РАН, ректор, зав. кафедрой клинической фармакологии и терапии им. Б. Е. Вотчала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-4496-3680. SPIN-код: 4525-7556

Karin B. Mirzaev — Dr. Sc. in medicine, Vice-Rector for Research and Innovation; Director of the Research Institute of Molecular and Personalized Medicine Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9307-4994

Natalia P. Denisenko — Ph. D. in medicine, Deputy Director of the Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Associate Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Therapy named after Academician B. E. Votchal, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-3278-5941

Sherzod P. Abdullaev — Ph. D. in biology, Head of the Department of predictive and prognostic biomarkers of the Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9001-1499

Anna S. Zhiryakova — Postgraduate student of the Department of Clinical Pharmacology and Therapy named after Academician B. E. Votchal, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-4192-654X

Yuliya V. Shevchuk — Postgraduate student of the Department of Clinical Pharmacology and Therapy named after Academician B. E. Votchal, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Valery I. Vechorko — Dr. Sc. in medicine, Filatov City Clinical Hospital №15, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3568-5065

Oleg V. Averkov — Dr. Sc. in medicine, Filatov City Clinical Hospital №15, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-3010-755X

Dmitry A. Sychev — D. Sc. in medicine, Professor, Academician of the RAS, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. SPIN code: 4525-7556, ORCID: 0000-0002-4496-3680

Инфекция *Helicobacter pylori* (хеликобактерной инфекции) у детей, больных астмой, и её связь с тяжестью заболевания

ХАСАН БАЗМАМУН¹, ВАХИД БАХРАМИ¹, ГОЛАМРЕЗА КАЛВАНДИ¹,
АББАС МОРАДИ¹, *МОХАММЕД ХОССЕЙН ЭСЛАМЯН¹,
ИРАДЖ ШАХРАМЯН², ФАТЕМА ПАРУЙЕ²

¹ Хамаданский университет медицинских наук, Хамадан, Иран

² Заболский университет медицинских наук, Забол, Иран

Evaluation of *Helicobacter pylori* Infection in Asthmatic Children and Its Relationship With Severity of the Disease

HASSAN BAZMAMOUN¹, VAHID BAHRAMI¹, GHOLAMREZA KALVANDI¹,
ABBAS MORADI¹, *MOHAMMAD HOSSEIN ESLAMIAN¹,
IRAJ SHAHRAMIAN², FATEME PAROOIE²

¹ Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

² Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

Резюме

Актуальность. Астма является одним из самых распространённых заболеваний, которым страдают более 300 млн человек во всем мире. *Helicobacter pylori* является одной из наиболее распространённых инфекций, в результате её колонизации слизистой оболочки желудка высвобождаются белки острой фазы, что может выявить патогенную связь между хеликобактерной инфекцией и воспалительными заболеваниями. **Цель исследования** — оценить хеликобактерную инфекцию у детей с астмой и её связь с тяжестью течения астмы.

Материал и методы. В этом контролируемом исследовании приняло участие 94 пациента (в возрасте от 2 до 18 лет), которые были разделены на две равные группы — с астмой и без астмы. Хеликобактерную инфекцию оценивали в двух группах с использованием сывороточных антител против *H. pylori* (IgG). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения SPSS 16. Были использованы статистические методы — критерий хи-квадрат и Т-критерий. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты. В астматической группе 36,2% случаев, а в контрольной группе 48,9% случаев имели положительный результат теста на *H. pylori* ($p = 0,211$). Выявлена достоверная связь между инфекцией *H. pylori* и продолжительностью астмы ($p = 0,002$), и возрастом пациентов ($p = 0,04$). Не было выявлено значимой связи между хеликобактерной инфекцией и полом, тяжестью астмы, семейным анамнезом астмы и тестами функции лёгких.

Вывод. Результаты этого исследования показали, что количество инфицированных *H. pylori* детей с астмой было ниже, чем в контрольной группе, но эта разница не была статистически значимой. Также была выявлена достоверная связь между инфекцией *H. pylori*, длительностью астмы и возрастом больных.

Ключевые слова: дети; бронхиальная астма; инфекция *Helicobacter pylori*

Для цитирования: Базмамун Хасан, Бахрами Вахид, Калванди Голамрез, Моради Аббас, Эсламян Мохаммед Хоссейн, Шахрамян Ирадж, Паруйе Фатема. Инфекция *Helicobacter pylori* (хеликобактерной инфекции) у детей, больных астмой, и её связь с тяжестью заболевания. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 7–8: 51–56. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-51-56>.

Abstract

Background. Asthma is one of the most common diseases in the world that affects more than 300 million people worldwide. *Helicobacter pylori* is one of the most common infection worldwide and its colonization in the gastric mucosa releases acute phase proteins that may reveal the pathogenic relationship between the infection and inflammatory diseases. The aim of this study was to evaluate of *H. pylori* infection in asthmatic children and its relationship with the severity of asthma.

Methods. In this case-control study, 94 patients (aged 2 to 18 years) were divided in two equal groups of asthmatic and non-asthmatic patients. *H. pylori* infection was assessed in two groups using serum anti-*Helicobacter pylori* antibody (IgG). Data were analyzed using SPSS 16 software. Chi-square test and T-test were performed. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results. 36.2% of cases in asthmatic group and 48.9% of cases in control group had positive *H. pylori* test ($P = 0.211$). There was a significant relationship between *H. pylori* infection and the duration of asthma ($P = 0.002$), as well as the age of patients

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: Больница Бесат, бульвар
Аятоллы Мотahari, площадь Ресалат, Хамадан, Иран.
E-mail: zblresearchcenter@gmail.com

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: Besat Hospital, Ayatollah Motahari
Boulevard, Resalat Square, Hamadan, Iran.
E-mail: zblresearchcenter@gmail.com

($P=0.04$). There was no significant relationship between *Helicobacter pylori* infection with patients' gender severity of asthma, family history of asthma and pulmonary function tests.

Conclusion. Results of this study showed that the incidence of *H. pylori* infection was lower in asthmatic children than the control group but this difference was not statistically significant. Also, there was a significant relationship between *H. pylori* infection with duration of asthma and age of the patients.

Keywords: children; asthma; *Helicobacter pylori* infection

For citation: Bazmamoun Hassan, Bahrami Vahid, Kalvandi Gholamreza, Moradi Abbas, Eslamian Mohammad Hossein, Shahramian Iraj, Parooie Fateme. Evaluation of *Helicobacter pylori* infection in asthmatic children and its relationship with severity of the disease. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 7–8: 51–56. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-51-56>.

Введение

Helicobacter pylori является одной из наиболее распространённых возбудителей инфекционных заболеваний в мире и имеет большее распространение в развивающихся странах. *H. pylori* поражает человека в раннем возрасте и часто, при отсутствии должного лечения, остаётся в организме [1]. Она колонизирует слизистую оболочку желудка и вызывает различные желудочно-кишечные заболевания, такие как гастрит, язвенная болезнь, MALT-лимфома и рак желудка [2–5], но её связь с некоторыми внекишечными заболеваниями, такими как заболевания дыхательных путей, неясна и требует дальнейшего изучения [6]. Астма является одним из наиболее распространённых детских заболеваний, и в последние годы её распространённость увеличилась. Хотя точные причины этого неясны, были предложены такие варианты, как размер семьи, изменения в привычках курения, подверженность орофекальным инфекциям, изменения жилищных условий, содержание животных, семейное образование и доход семьи [7–15]. Когда *H. pylori* колонизирует слизистую оболочку желудка, она высвобождает различные вещества, такие как белки-реактанты острофазного ответа, поэтому хеликобактерная инфекция может быть связана с заболеваниями, при которых активируются медиаторы воспаления или аутоиммунитет [16, 17].

Принимая во внимание вышеупомянутые данные, настоящее исследование было проведено для оценки распространённости инфекции *H. pylori* у детей с астмой и её связи с тяжестью заболевания.

Материал и методы

В рамках данного контролируемого исследования 47 пациентов в возрасте от 2 до 18 лет обратились в аллергологическую клинику больницы Бесат в Хамадане (филиал Хамаданского университета медицинских наук) в период с августа 2017 г. по август 2018 г., у которых аллерголог поставил диагноз бронхиальная астма. При этом контрольной группой считались 47 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту.

Критерии включения: пациенты с астмой в возрасте от 2 до 18 лет, направленные в аллергологическую клинику больницы Бесат в Хамадане (Иран), в период с августа 2017 г. по август 2018 г., у которых аллерголог поставил диагноз астма. **Критерии исключения:** пациенты, отказавшие от участия. У

Introduction

Helicobacter pylori is one of the most common causes of infectious diseases in the world and is more prevalent in developing countries. *H. pylori* affect the person early in life and often remain in the body if left untreated [1]. It colonizes in the gastric mucosa and causes various gastrointestinal diseases such as gastritis, peptic ulcer disease, MALT lymphoma and gastric cancer [2–5], but its association with some extra intestinal diseases such as respiratory tract diseases is not clear and needs further investigation [6]. Asthma is one of the most common childhood diseases and its prevalence has increased in recent years. Although the exact causes of this increase is unclear, causes such as family size, changes in smoking habits, exposure to orofecal infections, changes in dwellings, ownership of animals, family education, and family income, have been proposed [7–15]. When *H. pylori* colonize the gastric mucosa, it releases various substances such as proteins of the acute phase reactant, therefore, *H. pylori* infection can be associated with diseases in which inflammatory mediators or autoimmunity are activated [16, 17]. Considering the aforementioned findings, the present study was performed to evaluate the prevalence of *H. pylori* infection in children with asthma and its relationship with severity of the disease.

Material and Methods

In this case-control study, 47 patients aged 2 to 18 years referred to the allergy clinic of Besat Hospital in Hamadan (affiliated with Hamdan University of Medical Sciences) during August 2017 to August 2018 who had been diagnosed as asthma by an allergy specialist were enrolled the study. At the same time, 47 healthy individuals who were matched by age were considered as the control group.

Inclusion criteria included asthmatic patients aged 2 to 18 years referred to the allergy clinic of Besat Hospital in Hamadan, Iran, during August 2017 to August 2018 who had been diagnosed as asthma by an allergy specialist. **Exclusion criteria** included non-cooperative participants. From all participants, 5 cc bloods was obtained from basilic vein to quantitative measurement of *H. pylori* antibody (IgG) (IMMUNOLAB GmbH Frickenhausen, Germany) and ODs ≥ 0.05 were considered positive. The asthmatic group, based on the severity of asthma, was divided into three categories: mild persistent, moderate persistent and severe [18]. Demographic data were collected using a questionnaire. This study was approved by the Ethics Committee of Hamadan University of Medical Sciences with code IR.UMSHA.REC.1397.267 and informed consent was obtained from all subjects or their parents. This study was sup-

всех участников исследования было взято по 5 мл крови из локтевой вены для количественного определения антител к *H. pylori* (IgG) (IMMUNOLAB GmbH Frickenhausen, Германия), и OD $\geq 0,05$ считались положительными. Группа больных астмой была разделена на три категории в зависимости от тяжести заболевания: лёгкая персистирующая, средне персистирующая и тяжёлая [18]. Демографические данные были собраны с помощью анкеты. Это исследование было одобрено Комитетом по этике Хамаданского университета медицинских наук под кодом IR.UMSHA.REC.1397.267, от всех участников или их родителей было получено информированное согласие. Это исследование было поддержано вице-канцлером по исследованиям и технологиям Хамаданского университета медицинских наук (номер: 9704262224).

Статистический анализ. После сбора данных был проведён анализ с помощью программы SPSS 16. В этом исследовании статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Независимый *t*-критерий использовался для сравнения количественных показателей в двух группах, а критерий χ^2 использовался для сравнения качественных показателей.

Результаты

Из 94 участников 47 были в группе больных астмой, а 47 — в контрольной группе. Семнадцать пациентов (36,2%) в астматической группе и 23 (48,9%) в контрольной имели положительный результат теста, но эта разница не считалась статистически значимой ($p=0,211$). В группе астматиков, как показано в таблице, инфекция *H. pylori* достоверно коррелировала с продолжительностью астмы и возрастом пациентов, но не было значимой связи с полом, тяжестью астмы, семейным анамнезом астмы и результатами теста функции лёгких.

Обсуждение

Результаты этого исследования показали, что у детей с инфекцией *H. pylori* вероятность развития астмы была примерно на 13% ниже, но эта

ported by vice chancellor for research and technology of Hamadan University of Medical Sciences (no: 9704262224)

Statistical analysis. After data collection, analysis was done by SPSS 16 software. Significance level was considered less than 0.05 in this study. Independent *t*-test was used to compare quantitative measures in two groups and chi-square test was used to compare qualitative measures.

Results

Of the 94 participants, 47 were in the asthmatic group and 47 were in the control group. Seventeen cases (36.2%) in asthmatic group and 23 cases (48.9%) in control group had positive test but this difference was not statistically significant ($P=0.211$). In the asthmatic group, as shown in Table, *H. pylori* infection was significantly correlated with duration of asthma and age of patients, but there was no significant relationship with sex, severity of asthma, family history of asthma, and pulmonary function test.

Discussion

The results of this study showed that children with *H. pylori* infection had approximately 13% lower chance of developing asthma but this difference was not statistically significant. There was also a significant relationship between *H. pylori* infection with duration of asthma and age of the patients. The prevalence of asthma in recent years has been increasing for both genders of all ages and races. According to the Hygiene hypothesis, lack of contact with infection agents in the early years of life increases the susceptibility to allergic diseases by suppressing the normal development of the immune system and altering the TH1/TH2 ratio [19–21]. *H. pylori* remain in the gastric mucosal layers for many years, and its antibodies can persist in the body for rest of the life [16, 22]. It has been shown that colonization

Таблица 1. Распределение демографических и клинических характеристик между двумя группами
Table 1. Distribution of demographic and clinical characteristic between two groups.

Характеристика/Characteristic	<i>H. pylori</i> + (n=17)	<i>H. pylori</i> – (n=30)	Значение <i>p</i> / <i>P</i> -value
Mean(SD)/Среднее (CO)	9.34±2.8	7.50±3	0.04
Age(years)/Возраст (лет)			
C			
Мужской/Male	9 (53%)	16 (53%)	0.979
Женский/Female	8 (47%)	14 (47%)	
Duration of disease(months)/ Продолжительность заболевания (мес.)	31.36 ±12.19	19.36 ±12.21	0.002
Mean(SD)/Среднее (CO)			
Тяжесть заболевания/Severity of disease			
Лёгкая персистирующая/Mild persistent	7 (41%)	11 (36%)	0.946
Средне персистирующая/Moderate persistent	5 (29%)	9 (30%)	
Тяжёлая/Severe	5 (29%)	10 (33%)	
Семейный анамнез астмы/Familial history of asthma			
Отсутствует/None=20	7 (41%)	13 (43%)	0.978
Отец/Father=10	4 (24%)	6 (20%)	
Мать/Mother=7	3 (18%)	4 (13%)	
Братья и сёстры/Sister&brother=6	2 (11.7%)	4 (13%)	
Мать и отец/Mother&father=4	1 (5.8%)	3 (10%)	
Исследование функции лёгких/Pulmonary function tests			
Норма/Normal	15 (88%)	26 (87%)	0.628
Обструктивная болезнь/Obstructive disease	2 (12%)	4 (13%)	

разница не считалась статистически значимой. Также была выявлена значительная взаимосвязь между хеликобактерной инфекцией, продолжительностью астмы и возрастом пациентов. Распространённость астмы в последние годы увеличивается для обоих полов, а также всех возрастов и рас. Согласно гигиенической гипотезе, отсутствие контакта с инфекционными агентами в первые годы жизни повышает восприимчивость к аллергическим заболеваниям за счёт подавления нормального развития иммунной системы и изменения соотношения TH1/TH2 [19–21]. *H. pylori* остаётся в слоях слизистой оболочки желудка в течение многих лет, а антитела к ней могут сохраняться в организме до конца жизни [16, 22]. Было показано, что колонизация *H. pylori* слизистой оболочки желудка усиливает действие различных провоспалительных медиаторов, таких как цитокины и белки острой фазы, что указывает на их патогенетическую связь с заболеваниями, опосредованными медиаторами воспаления или индуцированными аутоиммунными механизмами [21]. Предыдущие исследования (в основном проведённые с участием взрослых пациентов) показали разные результаты в отношении связи между инфекцией *H. pylori* и астмой. По данным некоторых из этих исследований, у лиц с хеликобактерной инфекцией астма начиналась в более старшем возрасте, чем у неинфицированных пациентов [23–26].

В исследовании, проведённом Е. Fouda и соавт. в 2017 г. [27] на детях в возрасте от 1 до 17 лет с использованием сыровороточного измерения антител к *H. pylori* (IgG), хеликобактерная инфекция реже встречалась у пациентов с астмой и оказывала защитное действие против астмы. Также не было значимой зависимости между полом и возрастом детей с инфекцией *H. pylori*, но в случаях с более тяжёлым течением астмы была более низкая распространённость инфекции *H. pylori*. Другое исследование было проведено Т. Khamechian и соавт. в 2015 г. [28] на детях в возрасте от 5 до 18 лет, прошедших эндоскопию. Распространённость астмы была ниже у детей с инфекцией *H. pylori*.

В исследовании, проведённом I. L. Holster и соавт. в 2012 г. [29] на детях в возрасте от 7 до 9 лет с использованием антител против *H. pylori*, с точки зрения инфекции *H. pylori*, не было обнаружено существенных различий между двумя группами детей — с астмой и без астмы. Также в исследовании, проведённом А. Karimi и соавт. в 2012 г. [14] на детях в возрасте от 6 до 12 лет с использованием уреазных дыхательных тестов, не было обнаружено значительной связи между инфекцией *H. pylori* и астмой, и, как и в настоящем исследовании, была обнаружена значительная связь между инфекцией *H. pylori* и возрастом, а

of *H. pylori* in the gastric mucosa enhances various pro inflammatory mediators such as cytokines and acute phase proteins, indicating its pathogenic association with diseases that are mediated by inflammatory mediators or induced by autoimmunity mechanisms [21]. Previous studies (mostly conducted in adults) have shown different results on the association between *H. pylori* infection and asthma. According to some of these studies, in individuals with *H. pylori* infection, the onset of asthma occurred at an older age than in non-infected patients [23–26].

In a study conducted by Fouda et al., in 2017 on children aged 1 to 17 years, using serum anti-*H. pylori* Ab (IgG) measurement, *Helicobacter pylori* infection was less common in asthmatic patients and had a protective effect against asthma. Also there was no significant relationship between sex and age of children with *H. pylori* infection, but in the cases with more severity of asthma, there was, lower the prevalence of *H. pylori* infection [27]. In another study by Khamechian et al., 2015, on children aged 5 to 18 years who underwent endoscopy. Prevalence of asthma was lower in children with *H. pylori* infection [28].

In study by Holster et al., 2012, on children aged 7 to 9 years using anti-*H. pylori* antibody, no significant difference was found between the two groups of asthmatic and non-asthmatic children in terms of *H. pylori* infection [29]. Also in study conducted by Karimi et al., 2012, on children aged 6 to 12 years using urea breath tests, no significant association was found between *H. pylori* infection and asthma and similar to present study, there was a significant relationship between *H. pylori* infection and age and duration of asthma, but there was no statistically significant association with the severity of asthma [14].

Differences between the results of the studies may be due to factors such as the method used for diagnosis of *H. pylori*, population selection, sample size, geographical and socio-economic differences and living conditions of individuals.

Conclusion

The findings of this study showed no statistically significant relationship between *H. pylori* infection and the asthma in children. But there was a significant relationship between *H. pylori* infection and duration of the asthma and age of patients.

Acknowledgements. We would like to express our sincere thanks and deep gratitude to participants for allowing us to complete this study.

Conflict of interest. The results of this study are not in conflict with the interests of the authors.

Funding. This study was supported by vice chancellor for research and technology of Hamadan University of Medical Sciences (no: 9704262224).

также длительностью астмы, но не было статистически значимой связи с тяжестью астмы.

Различия между результатами исследований могут быть обусловлены такими факторами, как метод, использованный для диагностики *H. pylori*, выбор популяции, размер выборки, географические и социально-экономические различия и условия жизни отдельных лиц.

Заключение

Результаты этого исследования не показали статистически значимой связи между инфекцией *H. pylori* и астмой у детей. Но существовала значительная связь между хеликобактерной инфекцией, продолжительностью астмы и возрастом пациентов.

Дополнительная информация

Благодарности. Мы хотели бы выразить нашу искреннюю благодарность и глубокую при-

Литература/References

1. Malaty H.M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Best Practice Res Clin Gastroenterol. 2007; 21 (2): 205–214. doi: 10.1016/j.bpg.2006.10.005.
2. Cid T.P., Fernández M.C., Benito Martínez S. et al. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter. 2013; 18: 12–17. doi: 10.1111/hel.12076.
3. Harford W., Barnett C., Lee E. et al. Acute gastritis with hypochlorhydria: report of 35 cases with long term follow up. Gut. 2000; 47 (4): 467–472. doi: 10.1136/gut.47.4.467.
4. Huang J.Q., Zheng G.F., Sumanac K. et al. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology. 2003; 125 (6): 1636–1644. doi: 10.1053/j.gastro.2003.08.033.
5. Realdi G., Dore M.P., Fastame L. Extradiagnostic manifestations of *Helicobacter pylori* Infection (Fact and fiction). Dige diss. 1999; 44 (2): 229–236. doi: 10.1023/a:1026677728175.
6. Franceschi F., Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007; 21 (2): 325–334. doi: 10.1016/j.bpg.2006.10.003.
7. Bodner C., Anderson W., Reid T., Godden D.J. Childhood exposure to infection and risk of adult onset wheeze and atopy. Thorax. 2000; 55 (5): 383–387. doi: 10.1136/thorax.55.5.383.
8. Dijkstra L., Houthuijs D., Brunekreef B., Brunekreef I., Boleij J.S. Respiratory health effects of the indoor environment in a population of Dutch Children 1–3. Am Rev Respir Dis. 1990; 142: 1172–8. doi: 10.1164/ajrccm/142.5.1172.
9. Litonjua A.A., Carey V.J., Weiss S.T., Gold D.R. Race, socioeconomic factors, and area of residence are associated with asthma prevalence. Pediatr Pulmonol. 1999; 28 (6): 394–401. doi: 10.1002/(sici)1099-0496(199912)28:6<394::aid-ppul2>3.0.co;2-6.
10. Matricardi P.M., Rosmini F., Panetta V. et al. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. J Allergy Clin Immunol. 2002; 110 (3): 381–387. doi: 10.1067/mai.2002.126658.
11. Strachan D.P., Carey I.M. Home environment and severe asthma in adolescence: a population based case-control study. Bmj. 1995; 311 (7012): 1053–1056. doi: 10.1136/bmj.311.7012.1053.
12. Takafuji S., Suzuki S., Koizumi K. et al. Diesel-exhaust particulates inhaled by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. J Allergy Clin Immunol. 1987; 79 (4): 639–645. doi: 10.1016/s0091-6749(87)80161-6.
13. Wickman M., Nordvall S.L., Pershagen G. et al. House dust mite sensitization in children and residential characteristics in a temperate region. J Allergy Clin Immunol. 1991; 88 (1): 89–95. doi: 10.1016/0091-6749(91)90305-8.
14. Karimi A., Fakhimi-Derakhshan K., Imanzadeh F. et al. *Helicobacter pylori* infection and pediatric asthma. Iranian J Microbiology. 2013; 5 (2): 132.
15. Rowland M., Daly L., Vaughan M. et al. Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 2006; 130 (1): 65–72. doi: 10.1053/j.gastro.2005.11.004.

Информация об авторах

Хасан Базмамун — доктор, доцент, отделение детской гастроэнтерологии, Хамаданский университет медицинских наук, Хамадан, Иран. ORCID ID: 0000-0002-5085-5459

Ethical consideration. This study was conducted with the approval of the Ethics Committee of Hamadan University of Medical Sciences with code IR.UMSHA.REC.1397.26

знательность участникам за предоставленную нам возможность завершить это исследование.

Конфликт интересов. Результаты данного исследования не противоречат интересам авторов.

Финансирование. Это исследование было поддержано вице-канцлером по исследованиям и технологиям Хамаданского университета медицинских наук (номер: 9704262224).

Этические аспекты. Это исследование было проведено с одобрения Комитета по этике Хамаданского университета медицинских наук под кодом IR.UMSHA.REC.1397.26.

16. Jun Z.J., Lei Y., Shimizu Y. et al. *Helicobacter pylori* seroprevalence in patients with mild asthma. Tohoku J Exper Med. 2005; 207 (4): 287–91. doi: 10.1620/tjem.207.287.
17. Takahashi S., Nakamura E., Okabe S. Effects of cytokines, without and with *Helicobacter pylori* components, on mucus secretion by cultured gastric epithelial cells. Dig Dis Sci. 1998; 43 (10): 2301–2308. doi: 10.1023/a:1026635110099.
18. Bateman E.D., Hurd S., Barnes P. et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. Eur Res J. 2008; 31 (1): 143–178. doi: 10.1183/09031936.00138707.
19. Control CfD, Prevention. Vital signs: asthma prevalence, disease characteristics, and self-management education: United States, 2001–2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011; 60 (17): 547–52.
20. Eder W., Ege M.J., von Mutius E. The asthma epidemic. N Engl J Med. 2006; 355 (21): 2226–2235. doi: 10.1056/NEJMra054308.
21. Wang Y., Bi Y., Zhang L. et al. Is *Helicobacter pylori* infection associated with asthma risk? A meta-analysis based on 770 cases and 785 controls. International J Med Sci. 2012; 9 (7): 603–610. doi: 10.7150/ijms.4970. Epub 2012 Sep 14.
22. Kosunen T., Aromaa A., Knekt P. et al. *Helicobacter* antibodies in 1973 and 1994 in the adult population of Vammala, Finland. Epidemiol Infect. 1997; 119 (1): 29–34. doi: 10.1017/s0950268897007565.
23. Chen Y., Blaser M.J. Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. Arch Intern Med. 2007; 167 (8): 821–827. doi: 10.1001/archinte.167.8.821.
24. Reibman J., Marmor M., Filner J. et al. Asthma is inversely associated with *Helicobacter pylori* status in an urban population. PLoS One. 2008; 3 (12): e4060. doi: 10.1371/journal.pone.0004060. Epub 2008 Dec 29.
25. Zevit N., Balicer R.D., Cohen H.A. et al. Inverse association between *Helicobacter pylori* and pediatric asthma in a high-prevalence population. Helicobacter. 2012; 17 (1): 30–35. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00895.x.
26. Zhou X., Wu J., Zhang G. Association between *Helicobacter pylori* and asthma: a meta-analysis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2013; 25 (4): 460–468. doi: 10.1097/MEG.0b013e32835c280a.
27. Fouda E., Kamel T., Nabih E. et al. *Helicobacter pylori* seropositivity protects against childhood asthma and inversely correlates to its clinical and functional severity. Allergol Immunopathol (Madr). 2018; 46 (1): 76–81. doi: 10.1016/j.aller.2017.03.004.
28. Khamechian T., Movahedian A.H., Eskandari G.E. et al. Evaluation of the correlation between childhood asthma and *Helicobacter pylori* in Kashan. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8 (6): e17842. doi: 10.5812/jjm.8(6)2015.17842.
29. Holster I.L., Vila A.M.J., Caudri D. et al. The impact of *Helicobacter pylori* on atopic disorders in childhood. Helicobacter. 2012; 17 (3): 232–237. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00934.x. Epub 2012 Mar 20.

About the authors

Hassan Bazmatoun — MD. Associate professor. Department of pediatric gastroenterology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5085-5459

Бахид Бахрами — врач общей практики, Хамаданский университет медицинских наук, Хамадан, Иран. ORCID ID: 0000-0003-1799-7866.

Голамреза Калванди — доктор, доцент, отделение детской гастроэнтерологии, Хамаданский университет медицинских наук, Хамадан, Иран. ORCID ID: 0000-0002-3357-0662

Аббас Моради — магистр наук, кафедра общественной медицины, Хамаданский университет медицинских наук, Хамадан, Иран. ORCID ID: 0000-0003-4994-0936.

Мохаммед Хоссейн Эсламян — доктор, доцент, кафедра аллергологии и клинической иммунологии, Хамаданский университет медицинских наук, Хамадан, Иран. ORCID ID: 0000-0003-2842-4836

Ирадж Шахрамян — Научно-исследовательский центр детской гастроэнтерологии и гепатологии, Забольский университет медицинских наук, Заболь, Иран

Фатема Паруйе — Научно-исследовательский центр детской гастроэнтерологии и гепатологии, Забольский университет медицинских наук, Заболь, Иран

Vahid Bahrani — MD. General physician. Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1799-7866

Gholamreza Kalvandi — MD. Associate professor. Department of pediatric gastroenterology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3357-0662

Abbas Moradi — MSc. Department of community medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-4994-0936

Mohammad Hossein Eslamian — MD. (Corresponding author) Assistant professor. Department of allergy and clinical immunology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2842-4836

Iraj shahramian — Pediatric Gastroenterology and Hepatology research Center, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

Fateme Parooie — Pediatric Gastroenterology and Hepatology research Center, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

Методы реабилитационного лечения детей с задержкой психоречевого развития с аутичным спектром

Л. А. ТЕММОЕВА¹, Э. А. ГАЛАЕВА¹, *З. А. КАМБАЧОКОВА¹, З. М. АЛИЕВА¹,
Н. М. ТЕММОЕВ¹, З. Х. АКАЕВ¹, М. Х. ДЖАБРАИЛОВА², А. А. КАМБАЧОКОВА¹

¹ ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

² ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А. А. Кадырова» Медицинский институт, Грозный, Россия

Methods of Rehabilitation Treatment in Children with Delayed Psychoverbal Development Within The Autism Spectrum

LEILA A. TEMMOEVA¹, ELLINA A. GALAEVA¹, *ZARETA A. KAMBACHOKOVA¹,
ZUKHRA M. ALIEVA¹, NAZIR M. TEMMOEV¹, ZAUR KH. AKAEV¹,
MADINA KH. DZHABRAILOVA², AMINA A. KAMBACHOKOVA¹

¹ Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

² Kadyrov Chechen State University, Grozny, Russia

Резюме

Введение. В данной статье исследована инновационная методика — АВА-терапия, а также проективная методика «Детский рисунок», используемые в комплексе реабилитации детей с задержкой психоречевого развития (ЗПРР) с аутичным спектром.

Цель исследования — поиск новых эффективных методик реабилитации детей с ЗПРР с аутичными чертами личности.

Материал и методы. Было обследовано 180 пациентов в период 2019–2021 г. в возрастном диапазоне от 3 до 5 лет. **Результаты исследования.** У больных, проходивших АВА-терапию в комплексе реабилитационных мероприятий 2–3 курса наблюдаются значительные улучшения мелкой и крупной моторики, адаптации к социуму, когнитивной сферы, а также улучшения психологического состояния.

Ключевые слова: аутизм; ЗПРР; АВА-терапия; реабилитация

Для цитирования: Теммоева Л. А., Галаева Э. А., Камбачокова З. А., Алиева З. М., Теммоев Н. М., Акаев З. Х., Джабраилова М. Х., Камбачокова А. А. Методы реабилитационного лечения у детей с задержкой психоречевого развития с аутичным спектром. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 7–8: 58–60. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-58-60>.

Abstract

Introduction. The article explores the innovative method of ABA-therapy, as well as the projective method «Children's Drawing» used in the rehabilitation complex of children with delayed psychoverbal development within the autistic spectrum.

The aim of the study was to find new effective methods for the rehabilitation of children with delayed psychoverbal development and autistic personality traits.

Materials and methods. 180 patients were examined in the period from 2019–2021, the age range was 3–5 years.

Results. Significant improvements in fine and gross motor skills, social adaptation, cognitive sphere, as well as improvements in psychological experiences in young patients were observed in patients who underwent ABA therapy as part of a complex of rehabilitation measures in 2–3 courses.

Keywords: autism; delayed psychoverbal development; ABA therapy; rehabilitation

For citation: Temmoeva L. A., Galaeva E. A., Kambachokova Z. A., Alieva Z. M., Temmoev N. M., Akaev Z. Kh., Dzhabrailova M. Kh., Kambachokova A. A. Methods of rehabilitation treatment in children with delayed psychoverbal development within the autism spectrum. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 7–8: 58–60. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-58-60>.

Введение

Под аутизмом понимается явная необщительность, стремление уйти от контактов, жить в своём собственном мире. Иногда она оказывается просто характерологической чертой ребёнка, но бывает вызвана глубоким интеллектуальным недоразвитием и речевыми трудностями, невротическими расстройствами [1]. В большинстве этих случаев нарушение коммуникации оказывается следствием основной недостаточности: малая потребность в общении, трудности восприятия информации и понимания ситуации, хронический недостаток общения в раннем детстве, невозможность пользоваться речью. Характерны сложности в усвоении бытовых и социальных навыков [2, 3]. Задержка психоречевого развития (ЗПРР) у детей — это нарушение нормального темпа психического развития ребёнка. Патология включает в себя комплекс нарушений речи, мышления, памяти, внимания, эмоций, обычных поведенческих навыков, двигательных функций [1]. Ребёнок с трудом усваивает новые навыки, не может абстрактно мыслить, говорить, выполнить простые логические действия, использовать имеющиеся знания и умения в повседневной жизни [4, 5]. В современном мире отмечается рост числа пациентов с ЗПРР на фоне аутистического расстройства. В связи с этим растёт актуальность применения медицинской и психологической реабилитации, что приводит к значительному прогрессу в их развитии [6].

Цель исследования — изучить влияние АВА-терапии на улучшение психологических показателей и установление социального взаимодействия у детей с ЗПРР на фоне аутистического спектра.

Материал и методы

В период с января 2019 г. по декабрь 2021 г. под наблюдением находилось 180 пациентов с ЗПРР на фоне элементов аутизма. Из них 105 мальчиков и 75 девочек. Возрастной диапазон от 3 до 5 лет (включительно). Восстановительное лечение проводилось на базе ГКУЗ «Дом ребёнка специализированный» МЗ Кабардино-Балкарской республики (г. Нальчик). Программы составлялись индивидуально для каждого ребёнка, в соответствии с возрастом и степенью ЗПРР. Комплексная те-

рапия проводилась в течение 3–4 нед. и включала в себя балнеотерапию, кинезотерапию, ЛФК, монтеessori-педагогическую, а также метод АВА-терапии, проводимый профессионально обученным психологом. АВА-терапия — это интенсивная обучающая программа, которая основывается на поведенческих технологиях и методах обучения, АВА как научная дисциплина изучает влияние факторов окружающей среды на поведение и манипулирует этими факторами, чтобы изменить поведение пациента. При этом подходе все сложные навыки, включая речь, творческую игру, умение смотреть в глаза и другие, разбиваются на мелкие блоки — действия. Каждое действие разучивается с ребёнком отдельно, затем действия соединяются в цепь, образуя сложное действие. Взрослый жёстко управляет его деятельностью, Правильные действия закрепляются до автоматизма, неправильные — строго пресекаются. Для достижения желаемого поведения используют подсказки и стимулы как положительные, так и отрицательные, Закреплённым навык считается только тогда, когда ребёнок сможет выполнять это действие без ошибок в 80% ситуаций вне зависимости от того, в какой атмосфере и кем было дано задание [1]. В рамках обучающей программы по методике АВА, ребёнок всегда ведомый, его свобода и инициативность ограничены выбором обучающего взрослого. Для каждого больного составляется индивидуальный план поэтапного развития. Ребёнок может осваивать одновременно два–три не связанных между собой навыка, педагогом выстраивается чёткая система усложнения и поэтапного освоения всё новых и новых навыков [4]. Конечная цель АВА-терапии — дать ребёнку средства осваивать окружающий мир самостоятельно [1].

Также применялась проективная методика — «Детский рисунок» с целью исследования индивидуальных особенностей личности. Графическая деятельность для ребёнка естественна, она ему близка и приятна и не требует от него предпринимать исключительных волевых и интеллектуальных усилий, носит для ребёнка игровой характер и не вызывает тревожных переживаний. Данный тест имеет общий момент в проведении, а также интерпретации некоторых особенностей рисунков. Ход проведения теста состоит из двух частей: рисования и беседы после него. Что касается общих моментов интерпретации рисунков, то здесь речь пойдет о качестве рисуночных линий (нажим, направление, прерывность–непрерывность), о расположении рисунка на листе, о его размерах, наличии дополнительных деталей, а также о выбранной цветовой гамме.

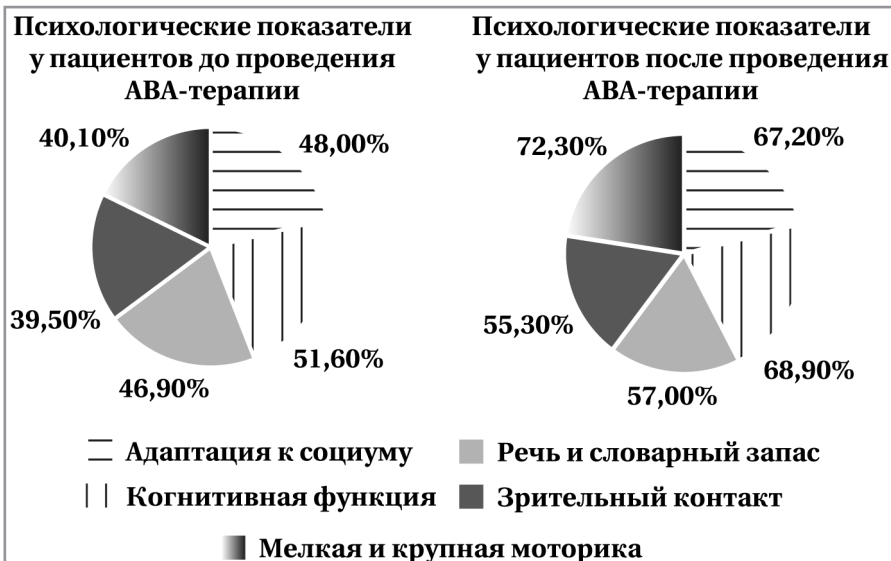
Результаты и обсуждение

В ходе работы с пациентами с ЗПРР на фоне аутистического расстройства было выявлено, что при комплексе реабилитационных мероприятий и использовании АВА-терапии удалось улучшить показатели у детей с ЗПРР на фоне аутистического расстройства. В 67,2% дети стали более адаптированы к социуму. Улучшилась когнитивная функция в 68,9% случаев (внимание — 29,4%; память — 21,2%;

Психологический анализ переживаний детей с задержкой психоречевого развития с аутичным спектром по проективному тесту «Детский рисунок».

Psychological analysis of the experiences of children with delayed psychoverbal development within the autistic spectrum according to the projective test «Children's drawing».

Психологические показатели	Группы детей	
	Дети до проективного теста «Детский рисунок» (%)	Дети после проективного теста «Детский рисунок» (%)
Склонность к депрессии	52,4	21,3
Повышенная тревожность	70	32,5
Агрессивность	57,5	30
Астения	62,5	20,5
Невротическое состояние	60	27,5



Психологические показатели у пациентов.
Psychological indicators in patients.

мышление — 18,3%). Коррекция речи и словарного запаса были отмечены у 57,0% наблюдаемых пациентов, а также прогресс зрительного контакта — у 55,3% детей. Мелкая и крупная моторика больных детей повысилась в 72,3% случаях (рисунок).

Как видно из таблицы, мы наблюдаем положительную динамику психологических особенностей у детей с ЗППР с элементами аутизма с помощью проективного теста «Детский рисунок». Психологические показатели после проведения теста значительно улучшились по сравнению с таковыми до те-

ста: склонность к депрессии составила 21,3%, уровень тревожности — 32,5% случаев, агрессивность была у 30% больных детей, астения — у 20,5% и невротическое состояние — у 27,5% больных.

Заключение

1. При тщательном наблюдении и анализе поведения ребенка, с помощью АВА-терапии возможно обучение правильному восприятию, выражению положительных эмоций, пониманию собственных чувств и устремлений.

2. При своевременной адекватной медикаментозной терапии и коррекционной ра-

боте дети с ЗППР с аутичным спектром могут быть вовремя подготовлены по программе массовой школы. Они могут научиться читать и писать, получив таким образом новые возможности для коммуникации и личностного развития, а также для формирования их «учебного поведения».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Литература/References

1. Мелешкевич О., Эрц Ю. Особые дети: введение в прикладной анализ поведения (АВА). М.: Издательство Бахрам, 2021. [Meleshkevich O., Ertz Yu. Osobyie deti: vvedenie v prikladnoy analiz povedeniya (ABA). M.: Izdatel'stvo Bakhram, 2021. (in Russian)]
2. Костин И.А. Помощь в социальной адаптации людям с расстройствами аутистического спектра. Диссертация на соискание ученой степени д.п.н., 2017. [Kostin I.A. Pomoshch' v sotsial'noy adaptatsii lyudyam s rasstrojstvami autisticheskogo spektra. Dissertatsiya na soiskanie uchenoy stepeni d.p.n., 2017. (in Russian)]
3. Барбера М.Л., Расмуссен Трейси. Детский аутизм и вербально-поведенческий подход. М.: Издательство Рама Паблишинг, 2017. [Barbera M.L., Rasmussen Treysi. Detskij autizm i verbal'no-povedencheskij podkhod. M.: Izdatel'stvo Rama Publishing, 2017. (in Russian)]

Информация об авторах

Теммеева Лейла Азретовна — д. м. н., профессор кафедры детских болезней, акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Медицинский факультет, Нальчик, Россия

Галаева Элина Ахметовна — аспирант кафедры психиатрии, наркологии, неврологии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Медицинский факультет, Нальчик, Россия

Камбачокова Зарета Анатольевна — д. м. н., профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Медицинский факультет, Нальчик, Россия

About the authors

Leila A. Temmoeva — D. Sc. in medicine, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Ellina A. Galaeva — post-graduate student of the Department of Psychiatry, Narcology, Neurology, Faculty of Medicine, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Zareta A. Kambachokova — D. Sc. in medicine, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Алиева Зухра Магомедгаджиевна — студентка ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Медицинский факультет, Нальчик, Россия

Темноев Назир Маликович — студент ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Медицинский факультет, Нальчик, Россия

Акаев Заур Хакимович — студент ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Медицинский факультет, Нальчик, Россия

Джабраилова Мадина Хизаровна — студентка ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А. А. Кадыева» Медицинский институт, Грозный, Россия

Камбачокова Амина Аслановна — студентка ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Медицинский факультет, Нальчик, Россия

Zukhra M. Alieva — student, Faculty of Medicine, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Nazir M. Temmoev — student, Faculty of Medicine, Kabardino-Balkarian State University named after H.M. Berbekov, Nalchik, Russia

Zaur Kh. Akaev — student, Faculty of Medicine, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Madina Kh. Dzhabrailova — student, Medical Institute, Kadyrov Chechen State University, Grozny, Russia

Amina A. Kambachokova — student, Faculty of Medicine, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Микропластик и его роль в сохранении и распространении генов резистентности к антибиотикам в морских экосистемах

*Б. Г. АНДРЮКОВ^{1,2}, Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ¹

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

² ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Школа медицины; Владивосток, Россия

Microplastics and Their Role in the Maintenance and Spread of Antibiotic Resistance Genes in Marine Ecosystems

*BORIS G. ANDRYUKOV^{1,2}, NATALYA N. BESEDNOVA¹, TATYANA S. ZAPOROZHETS¹

¹ Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia

² Far Eastern Federal University, School of Biomedicine; Vladivostok, Russia

Резюме

Одним из самых обсуждаемых вопросов о защите окружающей среды в науке и обществе является загрязнение природных экосистем пластиком и его воздействие на живые организмы. Свидетельством этому является поток многочисленных публикаций, появившихся в последние годы. Результаты проведенных исследований подтверждают, что загрязнение водных экосистем пластиковым мусором считается одной из самых серьезных глобальных экологических проблем. Особую озабоченность вызывает широкое распространение в Мировом океане продуктов фотоокисления и биологической деградации — микро- и наноразмерных частиц пластика (МП и НП), которые вносят основной вклад в биологические эффекты. Катастрофические экологические последствия заражения морских экосистем микропластиком связаны не только с экономическим ущербом, но и здоровьем людей, биобезопасностью марикультуры. Созданная человеком пластисфера является новой экосистемой, которая играет всё более значительную роль в жизни морских микроорганизмов. Биоплёнки, сформированные на шероховатых и гидрофобных поверхностях пластисферы, состоят из различных таксонов микроорганизмов и по составу отличаются от окружающих морских сообществ. Кроме того, они являются хранителями и переносчиками внутри- и внеклеточных генов антибиотикорезистентности (ARG). Целью обзора является обобщение современных сведений о загрязнении окружающей среды микропластиком в контексте его роли в сохранении и распространении патогенных бактерий и генов резистентности к антибиотикам в природных средах с акцентом на морские экосистемы.

Ключевые слова: пластик; окружающая среда; пластисфера; микро- и наночастицы пластика (МП и НП); горизонтальный перенос генов (HGT); гены антибиотикорезистентности (ARG)

Для цитирования: Андрюков Б. Г., Беседнова Н. Н., Запорожец Т. С. Микропластик и его роль в сохранении и распространении генов резистентности к антибиотикам в морских экосистемах. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 7–8: 61–70. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-61-70>.

Abstract

One of the most discussed issues in environmental science and society is plastic pollution of natural ecosystems and its impact on living organisms. This is evidenced by the flow of numerous publications that have appeared in recent years. The results of the studies confirm that the pollution of aquatic ecosystems with plastic waste is considered one of the most severe global environmental problems. The wide distribution of photooxidation and biological degradation products of micro- and nano-sized plastic particles (MP and NP) in the World Ocean is of particular concern, which make the main contribution to biological effects. Catastrophic environmental consequences of marine ecosystems contamination with microplastics are associated not only with economic damage, but also with human health and the biosecurity of mariculture. Human-made plastisphere is a new ecosystem that plays an increasingly significant role in the life of marine microorganisms. Biofilms formed on the rough and hydrophobic surfaces of the plastisphere consist of various taxa of microorganisms and differ in composition from the surrounding marine communities. In addition, they act as depositories and carriers of intra- and extracellular antibiotic resistance genes (ARGs). The purpose of the review is to summarize current information on environmental pollution by microplastics in the context

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: ул. Сельская, д. 1, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Роспотребнадзора; г. Владивосток, 690087.
E-mail: andrukov_bg@mail.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 1 Sel'skaya str., Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing Vladivostok, 690087 Russian Federation.
E-mail: andrukov_bg@mail.ru

of its role in the conservation and spread of pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes in natural environments with an emphasis on marine ecosystems.

Keywords: plastic, environment, plastisphere, micro- and nanoparticles of plastic (MP and NP), horizontal gene transfer (HGT), antibiotic resistance genes (ARG).

For citation: Andryukov B. G., Besednova N. N., Zaporozhets T. S. Microplastics and its role in the maintenance and spread of antibiotic resistance genes in marine ecosystems. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 7–8: 61–70. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-61-70>.

Введение

За последние десятилетия полимеры прочно вошли в нашу жизнь, и многие не могут представить свою повседневную жизнь без привычных и распространённых вещей из пластика. Однако, несмотря на удобство использования, всё чаще приходят сообщения о негативном воздействии пластиковых отходов на природные экосистемы, которые по темпам роста накопления превышают глобальные выбросы углерода [1–4].

В нашем традиционном представлении загрязнение пластиком окружающей среды, как правило, ассоциируется с неприглядными свалками мусора из бутылок, всевозможных изделий и пакетов. Однако это не совсем так. Под влиянием механического воздействия, фотоокисления и биологической деградации макрофрагменты пластика фрагментируются и превращаются в низкомолекулярные микро- (менее 5 мм, МП) и наноразмерные частицы (менее 100 нм, НП) [5–7], которые вносят основной вклад в биологические последствия загрязнения. В дальнейшем происходит их биообращение, миграция, поглощение морскими организмами, встраивание в их трофические цепи, после чего они становятся компонентами бентосных экосистем [5, 7].

Среди приоритетных пластиковых загрязнителей эксперты отмечают полиэтилен высокой и низкой плотности (ПЭВП и ПЭНП, ~55%), поли-

пропилен (ПП, ~17%), полистирол (ПС, ~8%), а также полиэстер, полиэтилентерефталат, поливинил хлорид, полиамиды и другие, составляющие в совокупности сложную динамическую смесь биодоступных и токсичных полимеров, в той или иной степени доступные для биodeградации бактериями [4, 8, 9] (табл. 1).

Наибольший вклад в пластиковое загрязнение природных экосистем вносят средства личной гигиены и косметические средства (микрогранулы, сорбенты, эксфолиаторы), абразивы и чистящие средства (частицы полиэстера, полиамида и поликарбоната), синтетические ткани и шины, а также упаковочный материал, на долю которого приходится более 60% мусора [3, 4, 7, 9].

Пластиковое загрязнение природных экосистем ещё недавно было в значительной степени экологической проблемой, однако в последние годы оно стало ассоциироваться с многофакторным негативным влиянием на здоровье человека и других живых организмов [10–12]. Одно из них связано с участием МП и НП в формировании резистентности к антибиотикам — глобальной угрозы общественного здравоохранения, связанной с опасной для будущего человечества терапевтической беспомощностью перед многими инфекциями [13–16].

При рассмотрении проблемы пластикового загрязнения одним из ключевых механизмов распространения антибиотикорезистентности яв-

Таблица 1. Приоритетные пластиковые загрязнители морских экосистем
Table 1. Priority plastic pollutants in marine ecosystems

Виды пластика	Маркировка*	Примеры конечной продукции	Химическая структура	Бактерии, способные к биodeградации
Полиэтилен высокой плотности (низкого давления), ПЭВП		Трубы, упаковка (тара), фасовка, медицинские изделия, игрушки, канцтовары, хозяйственные товары	$\left[\begin{array}{cc} \text{H} & \text{H} \\ & \\ -\text{C} & - & \text{C}- \\ & \\ \text{H} & \text{H} \end{array} \right]_n$	<i>Bacillus</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Comamonas</i> spp., <i>Delftia</i> spp., <i>Brevibacillus</i> spp.
Полиэтилен низкой плотности (высокого давления), ПЭНП				
Полипропилен, ПП		Тара, трубы, технические детали, разовая посуда, строительные материалы	$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}-\text{CH}_2- \end{array} \right]_n$	<i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Brevibacillus</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.
Полистирол, ПС		Тара, игрушки, ёмкости, блистеры, упаковка, утеплители, строительные материалы	$\left[\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ -\text{C}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{H} \end{array} \right]_n$	<i>Rhodococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Curvularia</i> spp.

Примечание. * — международный знак вторичной переработки.

Note. * — international sign of recycling.

ляется горизонтальный перенос генов устойчивости к антибиотикам (antibiotic resistance genes, ARG), особенно в концепции «океаноцентричности» [17, 18]. В этой связи в последние годы стала очевидной не только векторная функция микропластика, но и его активное участие в формировании микробных сообществ и конверсии в морских экосистемах мобильных генетических элементов (МГЭ), несущих ARG [19].

Результаты недавнего метагеномного исследования, проведённого в северной части Тихого океана [20], впервые обратили внимание специалистов на непосредственное участие МП и НП в распространении генетических детерминант антибиотикорезистентности. Концентрация ARG, избирательно сорбированных на поверхности фрагментов пластика, оказалась намного выше, чем в морской воде [20]. Аналогичные результаты были получены и в последующих исследованиях проб, взятых из речной воды [21, 22], почв [22–25], на очистных сооружениях [23, 25] и в других природных экосистемах [21, 26, 27].

Цель обзора — обобщение современных сведений о загрязнении окружающей среды микропластиком в контексте его роли в сохранении и распространении патогенных бактерий и генов резистентности к антибиотикам в природных средах с акцентом на морские экосистемы.

Пластиковое загрязнение Мирового океана

Пластиковое загрязнение морских экосистем является важным компонентом глобальной экологической проблемы загрязнения окружающей среды, которая за последние годы имеет тенденцию к обострению [3, 19]. Неконтролируемый сброс пластикового мусора и отсутствие международной программы по его утилизации привели к тому, что сегодня всевозможные компоненты этих полимеров являются главными и повсеместными загрязнителями всех природных экосистем (наземной, морской, пресноводной и атмосферной) [3, 10, 19, 28–31]. Океанский ареал обнаружения микропластика в поверхностных водах и донных отложениях простирается по всему миру от Арктики до Антарктики — удалённых регионов, считавшихся относительно нетронутыми антропогенным влиянием [19, 29, 32–36].

По мнению P. Villarrubia-Gómez и соавт. [37], необратимость последствий и глобальность масштабов распространения пластикового загрязнения в морских экосистемах соответствует угрозе планетарной химической катастрофы, которая по мере дальнейшего замусоривания может привести к серьёзным экологическим последствиям.

Большинство опубликованных исследований проблемы пластикового мусора сосредоточены

на глобальном загрязнении Мирового океана. Они показали его присутствие в открытом океане, включая антарктические и арктические зоны, материковые моря и прибрежные рекреации [3, 10, 19, 32, 34]. Микропластик обнаружен в морских донных отложениях, глубоководных океанских впадинах, во всех типах морской биоты, включая различные виды морепродуктов, употребляемых человеком в пищу. Его косвенное влияние на здоровье людей и биобезопасность марикультуры ещё предстоит изучить [7, 9, 10, 33, 38, 39].

Первые тревожные сообщения о пластиковом мусоре в Мировом океане стали появляться в конце 70-х годов прошлого века, когда в мире произошёл взрывной рост производства изделий из полимерных материалов, сыгравших важную роль в международном экономическом развитии [7]. В 2020–2021 гг. совокупный объём производства разнообразной и недорогой полимерной продукции для бытового использования в мире составил около 400 млн тонн в год, значительная часть которого (более 50%) использовалась однократно [5, 11, 27, 29]. Термин «одноразовый образ жизни» стал своеобразной характерной приметой индустриального общества, поддерживаемой общественным мнением [40, 41].

В 2021 г. эксперты Программы ООН по окружающей среде (United Nations Environment Program, UNEP) в докладе «Примирение с природой» («Making Peace with Nature») заявили, что загрязнение пластиковым мусором, составляющее более 85% совокупного океанского мусора, является одной из ключевых глобальных проблем современности [7]. Ежегодно в океаны попадает более 12,5 млн т пластика, приносящего катастрофические экологические последствия морским экосистемам, и экономический ущерб составляет свыше 13 млрд \$ [7, 42].

В наши дни шокирующая статистика загрязнения Мирового океана пластиковыми отходами ассоциируется не только с угрозой существования гидробионтов, но и всего человечества, а последствия воздействия на морскую экосистему считаются потенциально необратимыми [37, 40]. Если нынешние темпы выброса сохранятся в ближайшие годы, этот растущий поток пластикового мусора, накапливаясь в океанских круговоротах, к 2040 г. может утроиться [7, 40–42].

Например, площадь Большого тихоокеанского мусорного пятна (Great Pacific garbage patch) — скопления мусора антропогенного происхождения в северной части Тихого океана в 2020 г. достигла площади 1,6 млн км² (в три раза больше территории Франции) [35, 40]. Аналогичные по величине мусорные скопления мигрируют в субтропических зонах конвергенции в Атлантическом и Индийском океанах [34, 35].

Отсутствие стандартных протоколов определения степени пластикового загрязнения морских

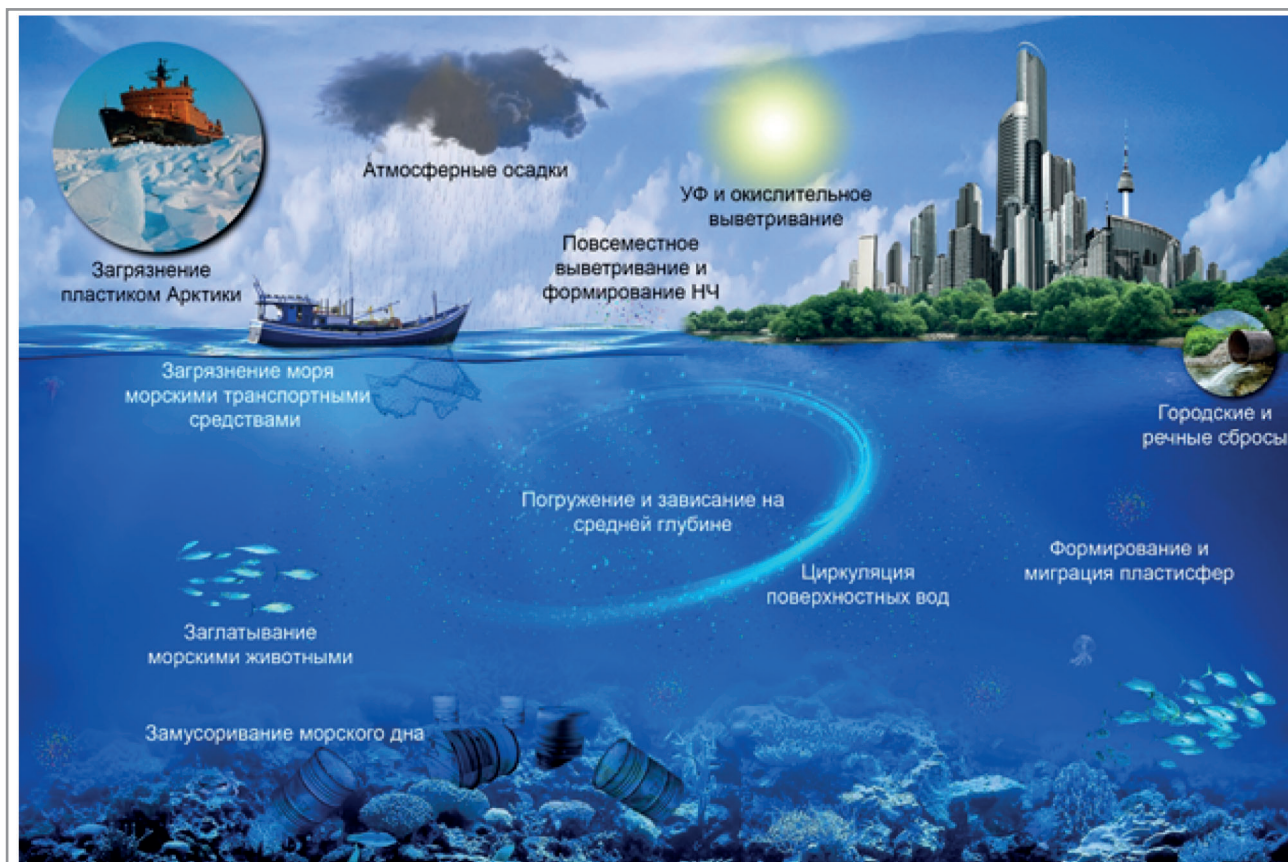
экосистем и применение различных методов отбора проб и спектроскопии в определённой мере затрудняют оценку содержания микропластика [15]. Однако по усреднённым оценкам специалистов в морской воде плавает более 5,25 трлн МП и НП, которые, наряду с крупными фрагментами, загрязняют около 88% поверхности Мирового океана и очень устойчивы к разложению, что позволяет им после биообращения встраиваться в трофическую цепь пелагических и придонных организмов. По данным ООН (2021 г.) фрагменты микропластика содержит каждая третья морская рыба, выловленная для употребления в пищу, и 100% молодняка морских черепах [7, 15, 42].

Загрязнение Мирового океана микропластиком происходит несколькими путями, включая неконтролируемый сброс мусора и отходов из городских агломераций, морской туризм, промышленное и прибрежное рыболовство, поступление сточных вод, речных отложений и другие источники, включая стихийные бедствия (рисунок).

Прямое и опосредованное вредное воздействие пластика на морские гидробионты может иметь физическую (механическую) или химическую (токсикологическую) природу [5, 39, 43]. Механическое воздействие связано с заглатыва-

нием морскими организмами МП и НП с последующим повреждением органов и тканей, что снижает пищевую ценность промысловых морепродуктов [38]. По данным F. K. Mammo и соавт. [44], H. Dong и соавт. [45], M. Arias-Andres и соавт. [46] и других авторов [47], фрагменты микропластика были обнаружены не только в желудочно-кишечном тракте, но и в мышечной ткани и печени креветок, крабов, рыб, мидий и устриц, что снижает их пищевую ценность. Таким образом, важным путём поступления микропластика в организм человека являются загрязнённые морепродукты, особенно в тех странах, в которых они являются основными в рационе питания и при отсутствии системы контроля [3, 7, 10, 19].

Химическое воздействие связано с постепенным выщелачиванием мономеров и пластиковых добавок, обладающих канцерогенным или агрессивным действием на различные биомолекулы живых организмов [3, 5, 7, 19]. Важно отметить, что пластик может выступать в качестве переносчика химических органических загрязнителей, имеющих высокое сродство к шероховатым и гидрофобным поверхностям многих полимеров, которые в дальнейшем вместе с их МП попадают в трофические цепи морских животных [7, 12, 19]. В



Источники поступления пластикового мусора в Мировой океан, его дальнейшая трансформация и потенциальные эффекты (рисунок авторов)

Sources of plastic waste entering the World Ocean, its further transformation, and potential effects (authors' Figure)

недавнем исследовании V. P. Chelomin и соавт. [5] было показано, что, несмотря на химическую инертность, при концентрации 10^6 частиц/л микропластики (ПС размером 0,9 мкм в диаметре, проявляют генотоксические свойства, которые выражаются в двукратном увеличении уровня повреждения клеточной ДНК пищеварительной железы у мидий [5].

Имеются убедительные доказательства того, что микроразмерные частицы размером менее 20 мкм, а также НП могут диффундировать в клетки и ткани морских организмов через пищеварительную систему, лимфу или кровь [11, 34, 38]. Токсическое воздействие микропластика на представителей морской биоты наблюдалось на поведенческом, репродуктивном, метаболическом уровнях и в появлении физических аномалий развития. Кроме того, были выявлены клеточные реакции, включая изменения в экспрессии генов, продукции активных форм кислорода и активности ферментов [11, 38, 48, 49].

До недавнего времени потенциал микропластика, как дисперсионного агента, не рассматривался [40, 41]. Только в последние годы пришло понимание, что пластиковые фрагменты представляют собой новый и прочный субстрат, колонизируемый морскими микроорганизмами, которые мигрируют на нём на большие расстояния, формируют микробные биоплёнки, состав которых зависит от типа пластика и может включать патогенные бактерии и токсичные виды морских водорослей [40, 50]. Поэтому в последние годы внимание экологов и микробиологов не случайно сосредоточено на изучении влияния пластикового мусора на водные экосистемы, прежде всего прибрежные морские зоны и открытый океан [9, 32, 33, 41].

Около 10 лет назад E. R. Zettler и соавт. [51] была предложена концепция «пластисферы» для описания новой, созданной человеком искусственной среды обитания и её роли в жизни разнообразных микроорганизмов в Мировом океане. Её суть состоит в том, что поверхность пластиковых частиц является новой экосистемой в составе морских экосистем. Биоплёнки, сформированные на микропластике, способствуют адсорбции не только загрязняющих веществ, таких как тяжёлые металлы и антибиотики, но и являются накопителями и переносчиками различных таксонов микроорганизмов, включая патогенные бактерии [17, 19, 24, 41, 51].

Разработка этой концепции рассматривается в наши дни в качестве основного механизма участия микропластика в распространении антибиотикорезистентности [40, 41, 52, 53]. Кроме того, особое внимание и озабоченность вызывают биологические эффекты МП и НП, поскольку их динамическая природа (размер, форма и заряд) меняются с

течением времени [11, 24]. Эти частицы вносят основной вклад в пластиковое загрязнение морских (а также пресноводных) экосистем [25, 34, 54].

Пластиковые МП и НП, дрейфующие в водных системах, служат подходящими субстратами для микробной колонизации вследствие их прочности, плавучести и сохранности в течение длительного времени. Различные биологические процессы, связанные с адсорбцией на их поверхности органических веществ или с формированием биоплёнок, могут существенно увеличивать их плотность, а физико-химические факторы морской среды — влиять на скорость микробной колонизации, поддерживая её богатство и разнообразие [24, 25, 34, 38]. К тому же эти процессы опосредуют возможность длительной миграции на большие расстояния, а также связанные с ней риски распространения патогенных микроорганизмов [10].

Примером тому являются обнаруженные недавно на морском микропластике в большом количестве различные виды *Vibrio* spp., включая *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* и *V. anguillarum* [3, 39, 40, 55]. Эстуарные зоны [20, 25, 26] и прибрежные рекреации [9, 32, 33] морских экосистем с более низкой солёностью воды являются наиболее благоприятными для существования и размножения патогенных и условно-патогенных видов бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. и *Arcobacter* spp., селективно обогатяющих микропластик [3, 25, 32, 56].

Для разнообразных таксонов микроорганизмов (например, микроводорослей, цианобактерий, бактерий, грибов, простейших) пластик является источником углерода, энергии, азота, ионов металлов [24, 57–59]. В процессе жизнедеятельности микроорганизмы биотрансформируют пластиковый мусор в соединения, которые могут представлять опасность для здоровья человека и морских гидробионтов [9, 16, 45, 46, 60]. Колонизируя частицы микропластика, микробы получают возможность не только эффективно поддерживать метаболизм. Доказана способность МП и НП положительно влиять на рост и формирование бактериальных сообществ, в составе которых создаются благоприятные возможности для распространения полезных для микроорганизмов свойств, например, способности метаболизировать полимеры. Установлено, что ранние этапы формирования биоплёнки характеризуются колонизацией пластисферы бактериями-деструкторами углеводов (*Rhodobacteraceae*, *Oleiphilus* spp.), к которым на последующих этапах присоединяются другие микроорганизмы [48, 61].

Таким образом, субстрат-специфическая колонизация микропластика бактериями способна изменить природный баланс в морских экосистемах, что потенциально может иметь для них катастрофические последствия.

Современные исследования микроорганизмов — обитателей пластисферы показали наличие в составе биоплёнок патогенных бактерий, что было признано ещё одним фактором риска. Большинство из них (например, представители рода *Vibrio*) являются потенциальными инфекционными агентами многих представителей аквакультуры, диких животных и людей [3, 39]. Кроме того, в биоплёнках, сформированных патогенными бактериями на фрагментах микропластика, могут создаваться благоприятные условия для горизонтального переноса генов (HGT), опосредующих синтез факторов вирулентности или кодирующих устойчивость к тяжёлым металлам и антибиотикам [18, 54, 62, 63].

Резистома пластисферы: роль микро- и наночастиц пластика в возникновении и распространении устойчивости к антибиотикам

Создание антибиотиков и их использование для лечения инфекционных заболеваний — одно из важнейших достижений человечества в области здравоохранения, которое лежит в основе современной медицины. Однако количество случаев инфекционных заболеваний и состояний, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), растёт во всем мире, и глобальный риск появления неизлечимых инфекций становится всё более реальным [14, 15]. На сегодняшний день, по оценкам специалистов, в странах Европейского Союза и США в результате бактериальных инфекций с МЛУ за год умирают по 30–35 тыс. пациентов [15]. Во всём мире устойчивость к противомикробным препаратам растёт угрожающими темпами. В 2019 г. ВОЗ включила устойчивость к противомикробным препаратам в десятку основных угроз для глобального здравоохранения и предсказала в ближайшие годы появление инфекционных заболеваний, при которых антибиотики будут бессильны [14, 15].

Антибиотикорезистентность является естественным явлением. Однако неправильное и чрезмерное использование антибиотиков привело к развитию, селекции и глобальному распространению в окружающей среде генетических детерминант устойчивости к антибиотикам, представляющих собой специфическую экологическую проблему [64, 65]. Бактерии могут быть изначально устойчивыми к определённым антибиотикам, но также могут приобретать устойчивость к ним в результате мутаций в хромосомных генах или путём горизонтального переноса ARG [54, 62, 63].

Некоторые патогенные виды грамотрицательных бактерий (включая вирулентные штаммы

E.coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и др.) продуцируют β -лактамазы расширенного спектра (extended-spectrum beta-lactamase, ESBL), способные гидролизовать цефалоспорины I–III поколения, пенициллины, карбапенемы, монобактамы [66, 67]. Наиболее значимыми и распространёнными среди плазмид-опосредованных β -лактамаз являются фенотипы ферментов TEM, OXA и SHV, с наличием которых, например, ассоциировано абсолютное большинство случаев с МЛУ среди клинических изолятов *E.coli* и *Klebsiella* spp. [68, 69]. ESBL распространены по всему миру, особенно в странах Азиатско-Тихоокеанского региона, индуцируя образование штаммов полирезистентных возбудителей [19, 29, 32, 52] (табл. 2).

Недавние исследования привели к идентификации многих генов, ответственных за врождённую устойчивость к антибиотикам разных классов, а также признание роли HGT как главной движущей силы эволюции бактерий. Кроме того, HGT способствует диссимиляции ARG как у клинических, так и у природных изолятов бактерий с участием мобильных генетических элементов, таких как плазмиды, транспозоны, бактериофаги, интроны, интегроны и другие [69, 71, 74].

Кроме того, биоплёнки сами являются стратегией коллективной защиты микроорганизмов от воздействия противомикробных препаратов [68, 74, 75]. МП и НП могут являться важными резервуарами генов устойчивости к антибиотикам, в свою очередь избирательно обогащаясь, ARG и являются потенциальными векторами для распространения их генов в морской среде. Изучение роли микропластика в распространении устойчивости к антибиотикам — относительно новая тема исследований, вызывающая в последние годы значительный интерес учёных [3, 13, 45, 75].

Большинство проведённых исследований показали, что микробиомы пластисферы отличаются от планктонных сообществ, а численность и многообразие ARG значительно превышают аналогичные показатели в окружающей среде. Кроме того, биоплёнки, сформированные на фрагментах пластика, отличаются повышенной плотностью, что увеличивает скорость обмена генами между филогенетически разными бактериальными таксонами, появлением у них не только резистентности к антибиотикам, но и способности к синтезу факторов вирулентности [46, 53]. Таким образом, микропластик участвует в эволюции бактерий, аккумулируя гены в концентрациях, оказывающих селективное давление на микроорганизмы.

При этом, несмотря на схожий состав и химическую структуру, МП и НП отличаются по ряду ключевых биологических характеристик (включая, транспортные свойства, биодоступность, взаимодействие с природными коллоидами и потенциальную токсичность). Наноразмерные фрагменты

Таблица 2. Приоритетные типы бактерий и доминирующие ARG-профили биоплёнок пластисфер в морской среде**Table 2. Priority bacterial types and dominant ARG profiles of plastisphere biofilms in the marine environment**

Районы исследования и типы пластика	Приоритетные типы бактерий	Доминирующие ARG-профили	Ссылки
Северотихоокеанский круговорот; Макро- и микропластик	Не исследовались	<i>cpxR</i> , <i>aac</i> (3)-I, <i>bac</i> A, <i>mac</i> B, <i>mexF</i> , <i>bcrABC</i> и МЛТУ	[19]
Балтийское море; микропластик	<i>Aeromonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., <i>E.coli</i>	Не исследовались	[29, 32]
Эстуарий Нижнего Везера (Германия) — Северное море; ПЭВП*	<i>E.coli</i>	β-лактамазы расширенного спектра действия (ESBL)	[25]
Эстуарий Янцзы, Китай; ПЭ, ПС, ПП	<i>Proteobacteria</i> <i>Cyanobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i>	Не исследовались	[70]
Прибрежные зоны, Яньтай (Китай), марикультура	<i>Cucumibacter</i> , <i>Cyclobacterium</i> , <i>Emcibacter</i> , <i>Marinicella</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Rubripirellula</i> , <i>Roseimaritima</i>	<i>tet</i> (<i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>tetX</i>), <i>sul</i> (<i>sul1</i> , <i>sul2</i>), <i>qnr</i> (<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>) и <i>erm</i> (<i>ermF</i> , <i>ermT</i>)	[71]
Аквакультура прибрежной рециркулирующей системы	<i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Planctomycetes</i>	<i>tetX</i> , <i>tetB</i> , <i>tetG</i> , <i>qnrS</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>ermF</i>	[30]
Северотихоокеанский круговорот; ПП, ПЭ	<i>Flavobacteriaceae</i>	МЛТУ, <i>rrs</i> , <i>bcrABC</i> ARG	[52]
Карибское море, микропластик	<i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i>	<i>Qnr</i> , <i>aac</i> (3)-I, <i>bla</i> _{CTX-M} и <i>bla</i> _{TEM} groups, <i>rpoB</i> , <i>cmlA</i> , <i>dfr</i> -ARG	[72]
Карибское море; 6 видов пластика	<i>Proteobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i>	Не исследовались	[73]
Восточное море, Китай, PE < 5 mm	<i>Cucumibacter</i> , <i>Cyclobacterium</i> , <i>Emcibacter</i> , <i>Marinicella</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>tetO</i> , <i>tetW</i> , <i>Chl</i> , <i>aac</i> (6')-Ib, <i>zntB</i> и <i>konA</i>	[74]
Северо-Тихоокеанский круговорот, PE, PP > 5 мм	<i>Marinicella</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Rubripirellula</i>	<i>aac</i> (3)-I, <i>bac</i> Транспортеры A, <i>mac</i> B, <i>mexF</i> , <i>cpxR</i> и ABC	[75]
Жёлтое море (Китай); ПЭ, ПП, ПЛА	<i>Proteobacteria</i> , <i>Cyanobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i>	MLS resistance genes	[6]
Западное побережье Норвегии; ПЭ, ПП	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>ampC</i> , <i>bla</i> _{OXA} , <i>cphA</i> , <i>qnrA</i> , <i>catB</i> , <i>bla</i> _{DHA} , <i>tetD</i> , <i>aac3</i> , <i>ampC</i>	[9, 32]
Система марикультуры; микропластик	<i>Vibrio</i> , <i>Muricauda</i> , <i>Ruegeria</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> и <i>sul3</i> ; <i>tetD</i> , <i>bla</i> _{TEM}	[39]

Примечание. * — ПЭВП – полиэтилен высокой плотности; ПЭ — полиэтилен; ПП — полипропилен; ПС — полистирол; ПЛА — полилактид (полимолочная кислота).

Note. * — ПЭВП — high density polyethylene; ПЭ — polyethylene; ПП — polypropylene; ПС — polystyrene; ПЛА — polylactide (polylactic acid).

пластика не только в сотни раз меньше МП по размеру, но и обладают физическими свойствами, которые позволяют им проникать внутрь бактериальной клетки, перенося с собой сорбированные гены, то есть выполнять функцию векторов. Следовательно, НП могут влиять на распространение ARG через различные механизмы [11, 34, 38].

Так, в недавнем исследовании J. Song и соавт. [27] оценивали геномный профиль почвенных бактерий на фрагментах небiorазлагаемых (полиэтилентерефталат, ПЭТ) и бiorазлагаемых (полигидроксикапроат, ПГА) видов пластика. Было установлено, что микрочастицы бiorазлагаемого пластика значительно изменяли составы ARG и

генов, контролирующих синтез факторов вирулентности (FVG). Сиквенс-анализ резистом на ПЭТ (3,05 копий) и ПГА (2,05 копий) выявил существенные различия по спектру генов, контролирующих лекарственную устойчивость. Кроме того, динамический анализ клеточного состава биоплёнок показал, что по сравнению с контролем на микропластик ПГА круг бактериальных сообществ ARG и FVG не только увеличился с 38,5% до 58,2%, но и произошла смена приоритетных видов бактерий-реципиентов: *Desulfovibrio* spp. и *Pseudomonas* spp. [27].

В качестве возможного объяснения этого феномена, авторы выдвинули гипотезу о возможном

участии в виде дополнительных источников углерода для микробной ассимиляции генерируемых биоразлагаемыми пластиками водорастворимых низкомолекулярных олигомеров [27]. Аналогичные результаты были получены и в другом исследовании [23, 30], однако в нём авторы расценили влияние на ARG сорбированных на пластике фталатов. При этом механизмы передачи генов устойчивости на МП и НП имеют свои особенности.

Например, J. Shi и соавт. [48] обнаружили, что НП пластика способны индуцировать выработку активных форм кислорода (АФК), которые потенциально увеличивают проницаемость бактериальной мембраны и таким образом облегчают передачу мобильных генетических элементов внутри биоплёнок. Аналогичным образом, G. Xu и соавт. [43] было показано, что НП способны индуцировать транслокацию ARG за счёт механизмов как прямого взаимодействия с мембранными липидами бактерий, так и косвенного эффекта, связанного с реакцией микроорганизмов на окислительный стресс.

Растущее в последние годы количество исследований доказывает корреляционное влияние НП и МП пластиков не только на микробный состав биоплёнок, но и профиль ARG [61, 76]. Основная причина такого феномена не совсем ясна и является предметом изучения. Одним из объяснений является избирательная привлекательность пластика для микроорганизмов, что способствует появлению на МП различных профилей ARG. Так, результаты исследований [61, 69, 76] показали, что биоплёнки на полистироловых МП избирательно обогащались ARG к сульфонидам (гены *sul*), стрептомицину (*strA* и *strB*), бета-лактамам (*bla_{TEM}*), хинолонам (*qnr*) макролидам (*mefA*), эритромицину (*ermB*) и тетрациклину (*tetM* и *tetQ*), а также к гену интегрон-интегразы класса I (*intI1*) [76]. Последний, как известно, имеет высокую корреляционную положительную связь с общим количеством ARG и может рассматриваться в качестве индикатора их множества [76]. Кроме того, этот микропластик избирательно колонизировался определёнными патогенными бактериями (11 видов), которые были идентифицированы как потенциальные хозяева ARG [61].

Серия исследований, проведённых в последние годы, показала, что доминирующими подтипами ARG, обнаруженными в составе биоплёнок на микропластике в морских экосистемах, являются гены МЛУ, устойчивые к некоторым металлам, сульфонидам и аминогликозидам [65, 70, 73, 77] и др. Напротив, гены резистентности к хлорамфениколу, фосмидомицину (антималарийный антибиотик), касугамицину (аминогликозидный антибиотик с широким спектром действия), рифамицину и ванкомицину встречаются исключительно редко [73]. Кроме того, отмечено, что ряд ARG селективно накапливались на микропластике, в первую очередь, это гены МЛУ (*smeE* и *mdsC*), устой-

чивости к бета-лактамам (*bla_{VEB-9}*) и аминогликозидам (*aadA13*, *APH (9)-Ia*, *APH (3'')-VI*, *aadA16*) [73].

Указанные особенности создают уникальные ARG-профили микропластическим биоплёнкам морских экосистем, которые отличают их от микробных сообществ, сформированных на других природных объектах [78–80]. Таким образом, микропластики оказывают значительное влияние на экологию морских микробных сообществ и активно участвуют в сохранении, накоплении и распространении генов, ответственных за устойчивость к антимикробным препаратам.

Заключение

Загрязнение морских экосистем микропластиком является одной из самых серьёзных экологических проблем на сегодняшний день. В наши дни значительное количество исследований сосредоточено на изучении пластикового замусоривания природных экосистем, прежде всего, в контексте экологического загрязнения окружающей среды. Однако такие важные аспекты проблемы, как бактериальная колонизация фрагментов микропластика и связанные с ней аккумуляирование и распространение генов резистентности к антибиотикам пока не до конца изучены. Очевидно, что формирующиеся на микропластике уникальные по составу микробные сообщества, содержащие в том числе патогенные бактерии, а также специфические ARG-профили создают идеальную возможность для горизонтальной передачи устойчивости к антимикробным препаратам, факторов вирулентности к различным таксонам микроорганизмов. Возможно, что основные метаболические пути функциональных генов, контролирующие обмен аминокислот и жирных кислот в микробном сообществе, также находятся под влиянием пластика.

В связи с важностью проблемы пластикового загрязнения Мирового океана, с одной стороны, необходима актуализация научных исследований системы пластисферы–биоплёнки–резистомы, а также изучение последствий влияния пластика на микробиоту кишечника, её богатство и разнообразие у млекопитающих, которое до сих пор остаётся неясным [60, 80, 81]. С другой стороны, необходимо чёткое понимание рисков для здоровья человека, нужна нормативная база для контроля и регулирования содержания микропластика в морской, речной и питьевой воде, продуктах питания. Наконец, большое значение имеет отработка единого протокола пробоподготовки и научно-обоснованной диагностической платформы для выявления и количественного учёта содержания микропластика в природных экосистемах и биосубстратах живых организмов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Mitrano D.M., Wohlleben W. Microplastic regulation should be more precise to incentivize both innovation and environmental safety. *Nat Commun.* 2020; 11: 5324. doi: 10.1038/s41467-020-19069-1.
- Isoke A., Iwasaki S., Uchida K., Tokai T. Abundance of non-conservative microplastics in the upper ocean from 1957 to 2066. *Nat Commun.* 2019; 10: 417. doi: 10.1038/s41467-019-08316-9.
- Bowley J., Baker-Austin C., Porter A., Hartnell R., Lewis C. Oceanic Hitchhikers - Assessing Pathogen Risks from Marine Microplastic. *Trends Microbiol.* 2021; 29 (2): 107–116. doi: 10.1016/j.tim.2020.06.011.
- Su Y., Zhang Z., Zhu J., Shi J., Wei H., Xie B., Shi H. Microplastics act as vectors for antibiotic resistance genes in landfill leachate: the enhanced roles of the long-term aging process. *Environ Pollut.* 2021; 270: 116278. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116278.
- Chelomin V.P., Mazur A.A., Slobodskova V.V., Kukla S.P., Dovzhenko N.V. Genotoxic properties of polystyrene (PS) microspheres in the filter-feeder mollusk *Mytilus trossulus* (Gould, 1850). *J Mar Sci Eng.* 2022; 10: 273. doi: 10.3390/jmse10020273.
- Zhang Q., Fan D., Pang X., Zhu W., Zhao J., Xu J. Effects of polyethylene microplastics on the fate of antibiotic resistance genes and microbial communities in anaerobic digestion of dairy wastes. *J Clean Prod.* 2021; 292: 125909. doi: 10.1016/j.jclepro.2021.125909.
- GESAMP Guidelines or the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean (Kershaw P.J., Turra A. and Galgani F. eds), IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP 2019; 99: 130.
- Ghafourian S., Sadeghifard N., Soheili S., Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol.* 2015; 17: 11–21.
- Radisic V., Nimje P.S., Bienfait A.M., Marathe N.P. Marine plastics from norwegian west coast carry potentially virulent fish pathogens and opportunistic human pathogens harboring new variants of antibiotic resistance genes. *Microorganisms.* 2020; 8 (8): 1200. doi: 10.3390/microorganisms8081200.
- Galloway T.S., Cole M., Lewis C. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nat Ecol Evol.* 2017; 1: 116. doi: 10.1038/s41559-017-0116.
- Sun Y., Wang J. How microplastics and nanoplastics shape antibiotic resistance? *Water Emerg Contam Nanoplastics.* 2022; 1: 8. doi: 10.20517/wecn.2022.09.
- Law K.L., Thompson R.C. Oceans. Microplastics in the seas. *Science* 2014; 345: 144–145. doi: 10.1126/science.1254065.
- Bank M.S., Ok Y.S., Swarzenski P.W. Microplastic's role in antibiotic resistance. *Science.* 2020; 369: 1315. doi: 10.1126/science.abd9937.
- Roberts S.C., Zembower T.R. Global increases in antibiotic consumption: a concerning trend for WHO targets. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21 (1): 10–11. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30456-4.
- WHO (2019 r.) No time to wait: protecting the future from drug-resistant infections. World Health Organization, Geneva <https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf> (дата обращения: 16.05.2022).
- Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13: 42–51. doi: 10.1038/nrmicro3380.
- Li L.G., Xia Y., Zhang T. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. *ISME J* 2017; 11: 651–662. doi: 10.1038/ismej.2016.155.
- Андрюков Б.Г., Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С. Мобильные генетические элементы прокариот и их роль в формировании резистентности к антибиотикам у патогенных бактерий. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 1–2: 62–74. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-1-2-62-74>. [Andryukov B. G., Besednova N. N., Zaporozhets T. S. Mobile genetic elements of prokaryotes and their role in the formation of antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 1–2: 62–74. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-1-2-62-74>. (in Russian)]
- Yang Y., Liu G., Song W., Ye C., Lin H., Li Z., Liu W. Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environ Int.* 2019; 123: 79–86. doi: 10.1016/j.envint.2018.11.061.
- Wang S., Xue N., Li W., Zhang D., Pan X., Luo Y. Selectively enrichment of antibiotics and ARGs by microplastics in river, estuary and marine waters. *Sci Total Environ.* 2020; 708: 134594. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134594.
- McCormick A., Hoellein T.J., Mason S.A., Schluep J., Kelly J.J. Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environ Sci Technol.* 2014; 48 (20): 11863–11871. doi: 10.1021/es503610r.
- Sarker A., Deepo D.M., Nandi R., Rana J., Islam S., Rahman S., Hossain M.N., Islam M.S., Baroi A., Kim J.E. A review of microplastics pollution in the soil and terrestrial ecosystems: A global and Bangladesh perspective. *Sci Total Environ.* 2020; 733: 139296. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139296.
- Lu X.M., Lu P.Z., Liu X.P. Fate and abundance of antibiotic resistance genes on microplastics in facility vegetable soil. *Sci Total Environ.* 2020; 709: 136276. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.136276.
- Ding J., Zhu D., Wang Y. et al. Exposure to heavy metal and antibiotic enriches antibiotic resistant genes on the tire particles in soil. *Sci Total Environ.* 2021; 792: 148417. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148417.
- Song J., Jongmans-Hochschulz E., Mauder N., Imirzalioglu C., Wichels A., Gerdts G. The Travelling Particles: investigating microplastics as possible transport vectors for multidrug resistant *E.coli* in the Weser estuary (Germany). *Sci Total Environ.* 2020; 720: 137603. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137603.
- Guo X.P., Sun X.L., Chen Y.R., Hou L., Liu M., Yang Y. Antibiotic resistance genes in biofilms on plastic wastes in an estuarine environment. *Sci Total Environ.* 2020; 745: 140916. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140916.
- Song R., Sun Y., Li X. et al. Biodegradable microplastics induced the dissemination of antibiotic resistance genes and virulence factors in soil: a metagenomic perspective. *Sci Total Environ.* 2022; 828: 154596. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154596.
- Wang J., Qin X., Guo J. et al. Evidence of selective enrichment of bacterial assemblages and antibiotic resistant genes by microplastics in urban rivers. *Water Res.* 2020; 183: 116113. doi: 10.1016/j.watres.2020.116113.
- Marathe N.P., Bank M.S. The microplastic-antibiotic resistance connection. In: Bank, M.S. (eds). *Microplastic in the environment: pattern and process. environmental contamination remediation and management.* Springer, Cham. 2022. doi: 10.1007/978-3-030-78627-4_9.
- Lu X.M., Chen Y.L. Varying characteristics and driving mechanisms of antibiotic resistance genes in farmland soil amended with high-density polyethylene microplastics. *J Hazard Mater.* 2022; 428: 128196. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.128196.
- Issac M.N., Kandasubramanian B. Effect of microplastics in water and aquatic systems. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021; 28 (16): 19544–19562. doi: 10.1007/s11356-021-13184-2.
- Radisic V., Lunestad B.T., Sanden M., Bank M.S., Marathe N.P. draft genome sequence of multidrug-resistant *Pseudomonas* protegens strain 11HC2, isolated from marine plastic collected from the West Coast of Norway. *Microbiol Resour Announc.* 2021; 10 (2): e01285–20. doi: 10.1128/MRA.01285-20.
- Erni-Cassola G., Wright R.J., Gibson M.I. et al. Early colonization of weathered polyethylene by distinct bacteria in marine Coastal Seawater. *Microb Ecol.* 2020; 79: 517–526. doi: 10.1007/s00248-019-01424-5.
- Peng L., Fu D., Qi H., Lan C.Q., Yu H., Ge C. Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats — a review. *Sci Total Environ.* 2020; 698: 134254. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134254.
- Lebreton L., Slat B., Ferrari F., Sainterose B., Aitken J., Marthouse R., Hajbane S., Cunsolo S., Schwarz A., Levivier A. Evidence that the great pacific garbage patch is rapidly accumulating plastic. *Sci. Rep.*, 2018; 8: 1–15. doi: 10.1038/s41598-018-22939-w.
- World Wildlife Fund (2020–2021): Internet portal [electronic resource]. Access mode: <https://www.wwf.org.uk/updates/how-does-plastic-end-ocean> (дата обращения 04.06.2022 г.).
- Eriksen M., Borgogno E., Villarrubia-Gómez P., Anderson E., Box C., Trenholm N. Mitigation strategies to reverse the rising trend of plastics in Polar Regions. *Environ Int.* 2020; 139: 105704. doi: 10.1016/j.envint.2020.105704.
- Haegerbaeumer A., Mueller M.-T., Fueser H., Traunspurger W. Impacts of micro- and nano-sized plastic particles on benthic invertebrates: a literature review and gap analysis. 2019; doi: 10.3389/fenvs.2019.00017.
- Zhang Y., Lu J., Wu J., Wang J., Luo Y. Potential risks of microplastics combined with superbugs: Enrichment of antibiotic resistant bacteria on the surface of microplastics in mariculture system. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020; 187: 109852. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109852.
- Amaral-Zettler L.A., Zettler E.R., Mincer T.J. Ecology of the plastisphere. *Nat Rev Microbiol.* 2020; 18 (3): 139–151. doi: 10.1038/s41579-019-0308-0.
- Zhao S., Zettler E.R., Amaral-Zettler L.A., Mincer T.J. Microbial carrying capacity and carbon biomass of plastic marine debris. *ISME J.* 2021; 15 (1): 67–77. doi: 10.1038/s41396-020-00756-2.
- United Nations Environment Programme (UNEP): Official site. Access code: https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/37946/UNEP_AR2021_RU.pdf (дата обращения: 11.06.2022).
- Xu G., Yu Y. Polystyrene microplastics impact the occurrence of antibiotic resistance genes in earthworms by size-dependent toxic effects. *J Hazard Mater.* 2021; 416: 125847. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125847.
- Mammo F.K., Amoah I.D., Gani K.M., Pillay L., Ratha S.K., Bux F., Kumari S. Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants. *Sci Total Environ.* 2020; 743: 140518. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140518.
- Dong H., Chen Y., Wang J., Zhang Y., Zhang P., Li X., Zou J., Zhou A. Interactions of microplastics and antibiotic resistance genes and their effects on the aquaculture environments. *J Hazard Mater.* 2021; 403: 123961. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123961.
- Arias-Andres M., Rojas-Jimenez K., Grossart H.-P. Collateral effects of microplastic pollution on aquatic microorganisms: an ecological perspective. *TrAC Trends Anal Chem.* 2019; 112: 234–240. doi: 10.1016/j.trac.2018.11.041.
- Roohi, Bano K., Kuddus M., Zaheer M.R., Zia Q., Khan M.E., Ashraf G.M., Gupta A., Aliev G. Microbial enzymatic degradation of biodegradable plastics. *Curr Pharm Biotechnol.* 2017; 18 (5): 429–440. doi: 10.2174/1389201018666170523165742.
- Shi J., Wu D., Su Y., Xie B. (Nano) microplastics promote the propagation of antibiotic resistance genes in landfill leachate. *Environ Sci: Nano.* 2020; 7: 3536–3546. doi: 10.1039/D0EN00511H.
- Azizi S.M.M., Haffiez N., Zakaria B.S., Dhar B.R. Thermal hydrolysis of sludge counteracts polystyrene nanoplastics-induced stress during anaerobic digestion. *ACS EST Eng* 2022. doi.org/10.1021/acsestengg.1c00460.

50. Wright R.J., Erni-Cassola G., Zadjelovic V., Latva M., Christie-Oleza J.A. Marine plastic debris: a new surface for microbial colonization. *Environ Sci Technol.* 2020; 54 (19): 11657–11672. doi: 10.1021/acs.est.0c02305.
51. Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. Life in the «plastisphere»: microbial communities on plastic marine debris. *Environ Sci Technol.* 2013; 47 (13): 7137–7146. doi: 10.1021/es401288x.
52. Yang K., Chen Q.L., Chen M.L. et al. Temporal dynamics of antibiotic resistance in the plastisphere during microbial colonization. *Environ Sci Technol.* 2020; 54: 11322–11332. doi: 10.1021/acs.est.0c04292.
53. Wang Z., Gao J., Zhao Y., Dai H., Jia J., Zhang D. Plastisphere enrich antibiotic resistance genes and potential pathogenic bacteria in sewage with pharmaceuticals. *Sci Total Environ.* 2021; 768: 144663. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144663.
54. Hu X., Waigi M.G., Yang B., Gao Y. Impact of plastic particles on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes to bacterium: dependent on particle sizes and antibiotic resistance gene vector replication capacities. *Environ Sci Technol.* 2022. doi: 10.1021/acs.est.2c00745.
55. Sun Y., Cao N., Duan C., Wang Q., Ding C., Wang J. Selection of antibiotic resistance genes on biodegradable and non-biodegradable microplastics. *J Hazard Mater.* 2021; 409: 124979. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124979.
56. Das S., Bombaywala S., Srivastava S. et al. Genome plasticity as a paradigm of antibiotic resistance spread in ESKAPE pathogens. *Environ Sci Pollut Res.* 2022; 29: 40507–40519. doi: 10.1007/s11356-022-19840-5.
57. Imran M., Das K.R., Naik M.M. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. *Chemosphere.* 2019; 215: 846–857. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.114.
58. Zhao Y., Gao J., Wang Z., Dai H., Wang Y. Responses of bacterial communities and resistance genes on microplastics to antibiotics and heavy metals in sewage environment. *J Hazard Mater.* 2021; 402: 123550. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123550.
59. Dai H., Gao J., Wang Z., Zhao Y., Zhang D. Behavior of nitrogen, phosphorus and antibiotic resistance genes under polyvinyl chloride microplastics pressures in an aerobic granular sludge system. *J Clean Prod.* 2020; 256: 120402. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.120402.
60. Francino M. Antibiotics and the human gut microbiome: dysbioses and accumulation of resistances. *Front Microbiol.* 2016; 6: 1543. doi: 10.3389/fmicb.2015.01543.
61. Shi J., Wu D., Su Y., Xie B. Selective enrichment of antibiotic resistance genes and pathogens on polystyrene microplastics in landfill leachate. *Sci Total Environ.* 2021; 765: 142775. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142775.
62. Salazade R., Manson A.L., Walker B.J. et al. Inter-species geographic signatures for tracing horizontal gene transfer and long-term persistence of carbapenem resistance. *Genome Med.* 2022; 14: 37. doi: 10.1186/s13073-022-01040-y.
63. Emamaliipour M., Seidi K., Zununi Vahed S., Jahanban-Esfahlan A., Jaymand M., Majidi H., Amoozgar Z., Chitkushev L.T., Javaheri T., Jahanban-Esfahlan R., Zare P. Horizontal gene transfer: from evolutionary flexibility to disease progression. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 229. doi: 10.3389/fcell.2020.00229.
64. Marques A., Diogène J., Rodriguez-Mozaz S. Non-regulated environmental contaminants in seafood: Contributions of the ECsafeSEAFOOD EU project. *Environ Res.* 2015; 143 (Pt B): 1–2. doi: 10.1016/j.envres.2015.09.029.
65. Yang L., Wang X., Ma J., Li G., Wei L., Sheng G.D. Nanoscale polystyrene intensified the microbiome perturbation and antibiotic resistance genes enrichment in soil and *Enchytraeus crypticus* caused by tetracycline. *Applied Soil Ecology.* 2022; 174: 104426. doi: 10.1016/j.apsoil.2022.104426.
66. Bush K., Bradford P.A. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020; 33 (2): e00047–19. doi: 10.1128/CMR.00047-19.
67. Huang Y., Zeng L., Doi Y., Lv L., Liu J.H. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20 (4): 404–405. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30115-8.
68. Abrar S., Ain N.U., Liaqat H., Hussain S., Rasheed F., Riaz S. Distribution of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA} genes in Extended-spectrum- β -lactamase-producing clinical isolates: A three-year multi-center study from Lahore, Pakistan. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019; 8: 80. doi: 10.1186/s13756-019-0536-0.
69. Paterson D.L., Bonomo R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18 (4): 657–86. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
70. Lu J., Zhang Y., Wu J., Luo Y. Effects of microplastics on distribution of antibiotic resistance genes in recirculating aquaculture system. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019; 184: 109631. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109631.
71. Huang F.Y., Yang K., Zhang Z.X., Su J.Q., Zhu Y.G., Zhang X. Effects of microplastics on antibiotic resistance genes in estuarine sediments. *Huan Jing Ke Xue.* 2019; 40 (5): 2234–2239.
72. Wang J.H., Lu J., Wu J., Zhang Y., Zhang C. Proliferation of antibiotic resistance genes in coastal recirculating mariculture system. *Environ Pollut.* 2019; 248: 462–470. doi: 10.1016/j.envpol.2019.02.062.
73. Wu X., Pan J., Li M., Li Y., Bartlam M., Wang Y. Selective enrichment of bacterial pathogens by microplastic biofilm. *Water Res.* 2019; 165: 114979. doi: 10.1016/j.watres.2019.114979.
74. Junaida M., Liuc X., Wub Y., Wang J. Selective enrichment of antibiotic resistance and bacterial pathogens by aquatic microplastics. *J. Hazardous Materials Advances.* 2022; 7: 100106. doi: 10.1016/j.hazadv.2022.100106.
75. Guo X.P., Sun X.L., Chen Y.R., Hou L., Liu M., Yang Y. Antibiotic resistance genes in biofilms on plastic wastes in an estuarine environment. *Sci. Total Environ.* 2020; 745: 140916. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140916.
76. Zheng W., Huiyan J., Tian Z., Zhang Y., Wen X. Clinical class 1 integron-integrase gene — a promising indicator to monitor the abundance and elimination of antibiotic resistance genes in an urban wastewater treatment plant. *Environ Int.* 2020; 135: 105372. doi: 10.1016/j.envint.2019.105372.
77. Sun R., He L., Li T. et al. Impact of the surrounding environment on antibiotic resistance genes carried by microplastics in mangroves. *Sci Total Environ.* 2022; 837: 155771. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155771.
78. Cheng Y., Lu J., Fu S., Wang S., Seneli N., Yuan Q. Enhanced propagation of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in municipal wastewater by microplastics. *Environ Pollut.* 2022; 292: 118284. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118284.
79. Peng C., Zhang X., Zhang X. et al. Bacterial community under the influence of microplastics in indoor environment and the health hazards associated with antibiotic resistance genes. *Environ Sci Technol.* 2022; 56: 422–432. doi: 10.1021/acs.est.1c04520.
80. Zhang P., Lu G., Sun Y., Yan Z., Dang T., Liu J. Metagenomic analysis explores the interaction of aged microplastics and roxithromycin on gut microbiota and antibiotic resistance genes of *Carassius auratus*. *J Hazard Mater.* 2022; 425: 127773. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127773.
81. Liu J., Lv M., Sun A. et al. Exposure to microplastics reduces the bioaccumulation of sulfamethoxazole but enhances its effects on gut microbiota and the antibiotic resistance of mice. *Chemosphere.* 2022; 294: 133810. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.133810.

Информация об авторах

Андрюков Борис Георгиевич — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0003-4456-808X. ResearcherID: J-3752-2018. eLIBRARY SPIN-код: 7757-3838. Scopus Author ID: 57191370698

Беседнова Наталия Николаевна — д. м. н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии «ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-2760-9778. eLIBRARY SPIN-код: 8931-9002. Scopus Author ID: 7006805123

Запорожец Татьяна Станиславовна — д. м. н., главный научный сотрудник лаборатории иммунологии «ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-2760-9778. ResearcherID: Y-9425-2018. eLIBRARY SPIN-код: 8931-9002. Scopus Author ID: 7006805123.

About the authors

Boris G. Andryukov — D. Sc. in medicine, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Far Eastern Branch of the State Research and Testing Institute of Military Medicine, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0003-4456-808X. ResearcherID: J-3752-2018. eLIBRARY SPIN: 7757-3838. Scopus Author ID: 571913

Natalia N. Besednova — D. Sc. in medicine, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-2760-9778. eLIBRARY SPIN: 8931-9002. Scopus Author ID: 7006805123

Tatyana S. Zaporozhets — D. Sc. in medicine, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-2760-9778. ResearcherID: Y-9425-2018. eLIBRARY SPIN: 8931-9002. Scopus Author ID: 7006805123

Роль молекул МНС I и II в антибактериальном иммунитете и лечении бактериальных инфекций

*Н. В. ПЕТРОВА^{1,2}, А. Г. ЕМЕЛЬЯНОВА^{1,2}, А. Л. КОВАЛЬЧУК², С. А. ТАРАСОВ^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

² ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Москва, Россия

The Role of MHC Class I and Class II Molecules in Antibacterial Immunity and Treatment of Bacterial Diseases

*NATALIYA V. PETROVA^{1,2}, ALEXANDRA G. EMEL'YANOVA^{1,2},
ALEXANDER L. KOVALCHUK², SERGEY A. TARASOV^{1,2}

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

² Research and Production Company Materia Medica Holding LLC, Moscow, Russia

Резюме

Некоторые бактериальные заболевания при прерывании курса терапии или неправильно подобранной схеме лечения могут приобретать хроническое течение. В таких случаях пациент становится носителем популяции устойчивых микроорганизмов, борьба с которыми весьма затруднительна. Это подталкивает научное сообщество к поиску более эффективных лекарственных средств. Тем не менее, процесс идёт по кругу с развитием антибиотикорезистентности к новым лекарственным препаратам. В связи с этим, необходимы новые подходы к созданию препаратов, механизм действия которых будет направлен не столько на патоген, сколько на защитные функции организма хозяина. Цель обзора — обобщение данных литературы относительно роли иммунной системы хозяина в процессе элиминации бактериального агента. В работе рассмотрены основные мишени антибактериальной терапии, описаны строение и работа белков главного комплекса гистосовместимости, приведены примеры исследований с использованием молекул-кандидатов, механизм действия которых направлен на усиление иммунного ответа хозяина. В статье представлена информация о механизмах влияния бактерий на экспрессию и презентацию антигенов белками МНС класса I и МНС класса II, рассматривается возможность воздействия на эти молекулы альтернативного подхода в терапии бактериальных инфекций. Мы полагаем, что белки главного комплекса гистосовместимости являются уникальной мишенью при лечении бактериальных инфекций с реализацией эффекта за счёт активации врождённого и адаптивного иммунного ответа хозяина. Описанный подход может послужить основой для создания нового класса препаратов, которые в дальнейшем могут быть использованы совместно с уже существующей антибактериальной терапией.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность; бактериальные инфекции; молекулы главного комплекса гистосовместимости; обзор

Для цитирования: Петрова Н. В., Емельянова А. Г., Ковальчук А. Л., Тарасов С. А. Роль молекул МНС I и II в антибактериальном иммунитете и лечении бактериальных инфекций. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 7–8: 71–81. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-71-81>.

Abstract

Some bacterial infections may become persistent and lead to chronic conditions when treatment was stopped prior to desired efficacy being achieved or when the treatment regimen was not optimized from the start. In such cases, the patient becomes a carrier of a population of resistant microorganisms, which are very hard to fight against. This prompts the scientific community to search for novel, more effective medicines. Untimely, the development of antibiotic resistance to new drugs spurs a vicious cycle. New approaches are needed to develop medications with greater efficacy, with their mechanism(s) of action directed not at the pathogen per se, but rather at the protective functions of the host organism. The purpose of this review is to summarize the literature on the role of the host immune system in elimination of bacterial pathogens. The paper discusses the main targets of antibacterial therapy, describes the structure and function of proteins of the major histocompatibility complex (MHC), and provides examples of studies using candidate molecules with mechanisms of action aimed at enhancing the host immune response. The article discusses mechanisms of bacterial influence on the expression of MHC class I and class II molecules and antigen presentation, as well as options to consider when targeting these molecules as an alternative approach in the treatment of bacterial infections. The authors suggest that MHC molecules are unique targets in the treatment of bacterial infections through the activation of the innate and the adaptive immune response of the host. This approach can serve as a platform for development of a new class of drugs that can be used in addition to the conventional antibacterial therapy.

Keywords: antibiotic resistance, bacterial infections, major histocompatibility molecules, review

For citation: Petrova N. V., Emelyanova A. G., Kovalchuk A. L., Tarasov S. A. The role of MHC class I and class II molecules in antibacterial immunity and treatment of bacterial diseases. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67: 7–8: 71–81. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-71-81>.

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: Балтийская ул., 8,
НИИ общей патологии и патофизиологии, г. Москва, Россия,
125315. E-mail: nataliyaapetrova89@gmail.com

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 8 Baltiyskaya st., Institute of General
Pathology and Pathophysiology Moscow, 125315 Russian Feder-
ation. E-mail: nataliyaapetrova89@gmail.com

Введение

Антибактериальные препараты (АБП) на протяжении уже более 70 лет являются важной частью фармацевтической промышленности, которая продолжает развиваться и эволюционировать [1]. Производство АБП увеличивается с каждым годом, в первую очередь, эта тенденция связана с появлением лекарственной устойчивости микроорганизмов, которая на сегодняшний день ставит под угрозу эффективность жизненно важных методов лечения для ряда бактериальных инфекций (БИ). За последние 40 лет на рынок вышли лишь несколько групп АБП (в т. ч. оксазолидиноны, плевомутилины, тиакумицины, стрептограммины), преимущественно предназначенные для лечения инфекций, вызванных грамположительными бактериями [2, 3], что связано со значительной сложностью подбора антибактериального агента, способного преодолеть клеточную стенку. В отношении грамотрицательных бактерий ситуация ещё более напряжённая, с 2015 г. были одобрены лишь 2 новых препарата относящихся к ингибиторам β -лактамаз, которые в комбинации с бета-лактамами антибиотиками эффективны в отношении грамотрицательных бактерий [4].

Эффективность АБП определяется множеством критериев. Прежде всего, это необходимость в избирательности и безопасности действия для эукариотических клеток. Кроме того, препарат должен иметь широкий антибактериальный спектр; обладать фармакологическими свойствами, которые смогут обеспечить его эффективное системное дозирование и отсутствие антагонистического действия при взаимодействии с другими терапевтическими средствами. Однако самым важным критерием и движущей силой разработки новых АБП остаётся антибиотикорезистентность или даже развитие множественной лекарственной устойчивости. Преодолеть порочный круг «разработка–устойчивость–разработка нового препарата» поможет создание лекарственных средств с принципиально новым механизмом действия, в основе которого лежит влияние на защитные силы организма хозяина, а именно, его иммунную систему.

Классические направления антибактериальной терапии на сегодняшний день рассматривают нарушение микроб-микробных взаимодействий [5], ингибирование бактериальных токсинов [6, 7], факторов адгезии и вирулентности (ФВ) [8]. Среди медикаментозных способов лечения БИ отмечают и использование специфических для определённых патогенов моноклональных антител (мАТ) [9]. Принципиально иным вариантом является воздействие на естественные защитные силы организма, его иммунную систему [10, 11]. Примером такого подхода является

вакциноterapia, применяемая при вяло и длительно текущих инфекционных заболеваниях [12, 13]. В основе вакцинотерапии лежит воздействие антигеном на инфицированный организм, в результате чего в нём возникает ряд иммунологических процессов, направленных на восстановление гомеостаза организма [14].

Данный подход является более универсальным, так как позволяет бороться со штаммами бактерий, обладающими множественной лекарственной резистентностью [15], и может оказаться более эффективным в случае хронических инфекций, а также при комбинированной терапии в сочетании с традиционными АБП для лечения БИ.

Таким образом, направленная на хозяина иммуномодулирующая терапия является многообещающим направлением, которое включает стимуляцию врождённых и адаптивных иммунных механизмов защиты организма.

Материал и методы

При подготовке настоящей статьи авторы руководствовались стандартным набором методов для написания обзоров. Поиск литературы проводился с марта 2020 г. по апрель 2021 г. Петровой Н. В. в базе данных PubMed.

Использовали следующие сочетания ключевых слов: «MHC antigen processing and bacterial infection», «MHC» AND «bacterial evasion», «immune system» AND «antibacterial therapy».

Критерии включения: статья посвящена БИ (*in vitro* или *in vivo* или клиническое исследование); в статье описан патоген, вызывающий инфекцию; в работе представлены критерии эффективности молекулы/препарата-кандидата в отношении изучаемой инфекции; обзоры, посвящённые проблематике БИ (патогенез и стратегии борьбы)

Критерии исключения: тезисы.

Работы были отфильтрованы вручную Петровой Н. В. Результаты исследований были проанализированы и обсуждались всеми соавторами обзора.

Иммунопатогенез бактериальных инфекций

Для лучшего понимания сути иммуномодулирующей терапии кратко рассмотрим основные этапы активации иммунной системы хозяина при БИ.

Бактерии, проникая через эпителиальные барьеры тела, атакуются клетками и молекулами врождённого иммунного ответа (ИО). Ключевую роль здесь играют клетки системы мононуклеарных фагоцитов и нейтрофилы, рецепторы которых способны распознавать общие компоненты многих бактерий. Мигрировав к месту заражения, эти клетки фагоцитируют бактерии, а взаимодействие с патогеном приводит к их активации, повышая секрецию цитокинов, хемокинов, антимикробных пептидов, активных форм кислорода и азота, инициируя таким образом процессы неспецифического иммунного ответа. Было показано, что естественные киллеры (НК-клетки), путём взаимодействия с другими клетками иммун-

ной системы также учувствуют борьбе с бактериальной инфекцией. Установлено, что активация NK-клеток приводит к высокой выработке ИФН- γ , цитокинов (ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10) и хемокинов (CXCL1, CCL1, CCL2 CXCL16 и т. д.), с последующей реализацией эффекта за счёт данных белков. Кроме того, NK-клетки экспрессируют Toll-подобные и NOD-подобные рецепторы, что подтверждает их непосредственное участие в антибактериальном ответе [16].

Активация системы комплемента — ещё один путь индукции местного воспаления и фагоцитоза бактерий. Связанные компоненты комплемента распознаются соответствующими рецепторами макрофагов, и опсонизированные микроорганизмы захватываются этими клетками [17].

Тем не менее, в ряде случаев фагоциты не способны подавить размножение бактерий. Ярким примером служат внутриклеточно паразитирующие бактерии (микобактерии, бруцеллы, сальмонеллы и др.), которые отличаются повышенной устойчивостью к фагоцитозу [18]. Эти бактерии уничтожаются механизмами адаптивного Т-клеточного иммунитета [19], а также за счёт опсонизации антителами [20]. Одним из вариантов подобного ответа может быть активация специфических цитокин-продуцирующих Т-хелперов, которая в дальнейшем приводит к усиленной выработке интерферона-гамма (ИФН- γ), активирующего эпителиальные клетки и макрофаги. Однако ключевым механизмом является индукция Т-киллеров, которые разрушают инфицированные клетки, делая их доступными для других факторов антибактериальной защиты хозяина. Важнейшую роль в данном процессе играют дендритные клетки (ДК). Поглощая патоген в заражённой ткани, ДК активируются и созревают в высокоэффективные антиген-презентирующие (зрелые) клетки, представляют антигены, образуя их комплексы с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) I, II классов и CD1. Антиген-содержащие комплексы презентуются Т- и NKT-клеткам, что в дальнейшем служит сигналом к запуску адаптивного ИО [19].

Рассматривая инфекцию как нарушение взаимодействия «хозяин-патоген», механизм действия новых лекарственных средств гипотетически может быть направлен на модулирование как врождённого, так и адаптивного ИО, повышая активность фагоцитов и экспрессию антимикробных факторов.

Усиление иммунного ответа хозяина как альтернативный подход в терапии БИ

Одним из известных примеров молекул-кандидатов в терапии БИ, механизм действия которых, помимо прямого действия на бактерии, направлен

и на иммунную систему хозяина, являются антимикробные пептиды (АМП) [21]. Эти белки являются ключевыми агентами врождённого иммунитета, представляют собой консервативные молекулы длиной менее 60 аминокислот, которые являются ключевым компонентом систем иммунной защиты различных организмов — от прокариот до людей [22]. Антибактериальная активность АМП объясняется их мембранолитическими свойствами. Воздействуя на поверхность бактериальных клеток, эти пептиды нейтрализуют отрицательный заряд на внешней поверхности мембраны грамотрицательных бактерий, нарушая её структуру и проникая внутрь периплазматического пространства [23].

Было показано, что АМП являются мощными хемоаттрактантами, способными рекрутировать АПК, способствуя повышению эффективности механизмов приобретённого ИО [24]. АМП также показали свою активность и в отношении привлечения тучных клеток [25]. Калецидин LL-37, обнаруженный в гранулах нейтрофилов, является антимикробным агентом, который способствует выработке ИЛ-8 и рекрутингу лейкоцитов в очаг воспаления [26, 27]. LL-37 также предотвращает гибель нейтрофилов [28], однако способствует апоптозу клеток других типов [29, 30], предотвращая таким образом размножение в них патогена.

Тем не менее, существуют и ряд сдерживающих факторов в применении АМП, основным из которых является высокая стоимость производства. Ещё одним значимым ограничением в использовании этих пептидов является вариабельность данных: активность АМП *in vitro* не всегда подтверждается результатами клинических исследований [31]. Ввиду отсутствия избирательности действия также необходим и более тщательный анализ потенциального токсического действия АМП на здоровые клетки и ткани организма хозяина [32].

Природные соединения, полученные из животных, лекарственных трав и бактерий (пробиотики), также участвуют в регуляции иммунного ответа и продемонстрировали свою эффективность в качестве терапевтических агентов (иммуномодуляторов) при различных расстройствах, в том числе и при БИ [33]. Тем не менее, их широкое использование ограничивает недостаточность данных, большинство работ по изучению эффективности проведено *in vitro* и требует подтверждения на более сложном организменном уровне.

Использование некоторых МАТ в борьбе с БИ также может быть направленно на усиление ИО хозяина. Многообещающие результаты были показаны для МАТ к белку PD-1 (экспрессирован на поверхности Т- и В-лимфоцитов, а также макрофагах; отвечает за отрицательную регуляцию иммунной системы, предотвращая активацию Т-клеток) в отношении *M. tuberculosis*. Так, введение

ние МАТ к PD-1 восстанавливало секрецию цитокинов, пролиферацию и цитолитическую активность циркулирующих Т- и NK-клеток [34, 35]. Авторы этих работ сделали вывод, что использование анти-PD-1 в дополнение к стандартной терапии туберкулёза антибиотиками может усилить антимикобактериальный эффект последней.

Ещё одним подходом в борьбе с БИ является воздействие на Толл-подобные рецепторы (TRL), представляющие собой семейство консервативных патогенраспознающих рецепторов. На сегодняшний день у человека было идентифицировано 10 TRL, экспрессированных либо на поверхности клеток, либо в эндосоме. Поверхностные TRL в основном распознают компоненты клеточной мембраны патогена, тогда как эндосомальные TRL чувствительны к нуклеиновым кислотам. Кроме того, было показано, что TLR распознают молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP), включая белки теплового шока, мочевую кислоту, гепарин, ДНК метаболиты и т. д. [36].

Антибактериальная активность агонистов TLR реализуется за счёт активации сигнальных путей (митоген-активируемый протеинкиназный путь или же сигнальный путь NF-κB), что способствует индукции механизмов врождённого иммунного ответа.

Одним из примеров использования агонистов TLR в отношении БИ является флагеллин. Было показано, что его введение защищает от инфекций *Streptococcus pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* [37, 38]. Препарат CADI-05, также являющийся агонистом TLR и представляющий собой инактивированные бактерии *Mycobacterium indicus pranii*, используется совместно с антибиотикотерапией для лечения проказы [39].

Тем не менее, использование подобного рода веществ ограничено сложностью взаимодействий между патогеном и организмом хозяина, результаты стимуляции врождённого иммунного ответа труднопредсказуемы.

Наконец, применение провоспалительных цитокинов, например, ИФН-γ [40], ИЛ-18 [41] или ГМ-КСФ [13, 42] как отдельно, так и совместно с противомикробными препаратами может также являться одним из подходов к воздействию на ИО. Его потенциал иллюстрируется испытаниями на животных [42] и пациентах с грибковыми заболеваниями, в которых терапия антимикотическими средствами в сочетании с рекомбинантным гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) оказалась лучше стандартной схемы — без использования ГМ-КСФ [43].

Тем не менее, перед применением провоспалительных цитокинов в качестве дополнительной терапии БИ необходимо учитывать, что, во-первых, большинство исследований было выполнено на экспериментальных животных моделях, и во-вто-

рых, введение этих молекул так же, как АМП и агонистов TRL, может вызвать признаки системной воспалительной реакции, поскольку механизм их действия в основном сфокусирован на активации врождённого [44], а не приобретённого ИО.

Таким образом, опосредованная лекарственной терапией активация врождённого ИО представляется рискованным подходом ввиду неспецифичности реакции, гиперактивация которой способна привести к выбросу большого количества цитокинов и развитию неконтролируемого системного воспаления [45]. В связи с этим, поиск новых мишеней скорее стоит сконцентрировать на адаптивном ИО, так как он является высокоспецифичным, а, следовательно, при воздействии на него снижается риск возможных системных и побочных эффектов [46, 47].

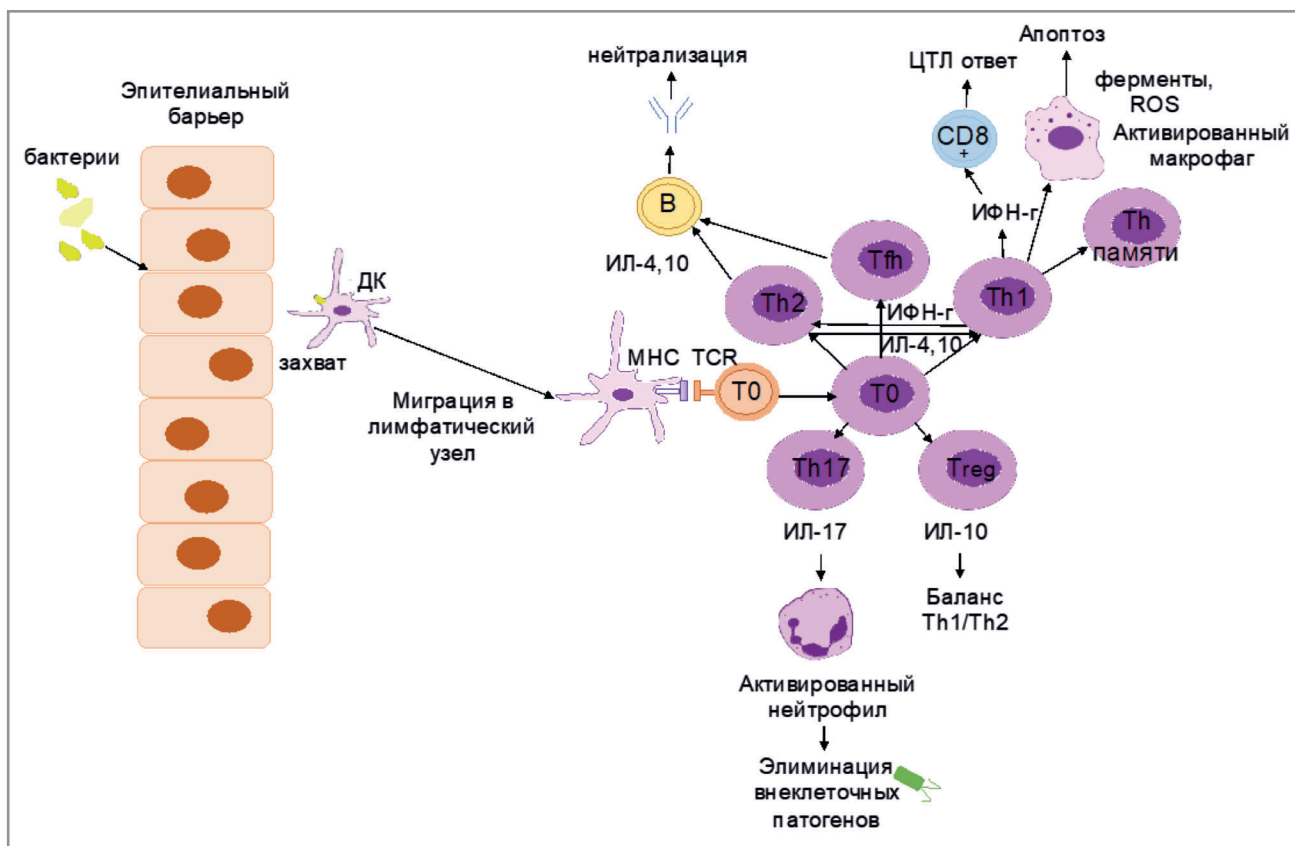
Для того, чтобы выбрать молекулу-мишень для разработки нового АБП необходимо выделить протеины, наиболее значимые для формирования адаптивного ИО.

Запуск адаптивного иммунного ответа осуществляется макрофагами и ДК, с последующим вовлечением В- и Т-лимфоцитов в данный процесс. Антигенные рецепторы на В-клетках представляют собой иммуноглобулины (Ig), а на Т-клетках — Т-клеточные рецепторы (ТКР). В то время как Ig связывается со свободным антигеном в его нативной форме, ТКР связывает только фрагменты антигенов, которые представлены на молекулах МНС, экспрессированных на поверхности АПК. Таким образом, молекулярными маркерами для адаптивного иммунитета являются — Ig, ТКР и белки МНС [48] (рисунок).

Наиболее перспективной мишенью для разработки АБП, на наш взгляд, можно считать молекулы МНС ввиду того, что данные белки экспрессируются большим количеством клеток: МНС I представлен на всех ядродержащих клетках, МНС II — на поверхности АПК, таких как ДК, макрофаги, В-клетки, а также на некоторых эндотелиальных и эпителиальных клетках. Воздействуя на данную мишень, можно ожидать усиления всех путей адаптивного ИО и, как следствие, более быстрого снижения бактериальной нагрузки при инфекции. Соответственно, стоит рассмотреть взаимное влияние возбудителя и белков МНС I/МНС II при развитии БИ, чтобы оценить потенциал предложенной нами мишени.

Влияние бактерий на экспрессию, процессинг и презентацию антигена по пути МНС II

Узнавание антигена иммунной системой происходит за счёт его представления на поверхности клеток молекулами МНС. Для связывания с бел-



Схематическое изображение адаптивного ИО хозяина при БИ.

Патогены, преодолевая эпителиальный барьер, захватываются ДК и представляются наивным Т-клеткам, что приводит к активации и пролиферации антиген-специфичных эффекторных Т-клеток. В зависимости от микроокружения $CD4^+$ клетки дифференцируются в эффекторные (Th1, Th2, Tfh, Th17) или регуляторные (Treg) клетки. Th1 лимфоциты активируют макрофаги и $CD8^+$ клетки посредством продукции ИФН- γ . Макрофаги подвергают внутриклеточные патогены воздействию лизосомальных ферментов, а также метаболитов активных форм кислорода и азота. Цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки уничтожают патогены посредством высвобождения перфорина и гранзимов, вызывая апоптоз инфицированных клеток. Клетки Th2 и Tfh активируют В-лимфоциты, инициируя выработку антител, которые нейтрализуют патоген. Th17 приводят к активации нейтрофилов, которые участвуют в элиминации внеклеточных и некоторых внутриклеточных бактерий. Treg поддерживают Th1/Th2 баланс. Рисунок выполнен по материалам, опубликованным в [49].

Schematic representation of adaptive immune response of the host in bacterial infection.

Pathogens are captured by dendritic cells after passing through the epithelial barrier and presented to naive T cells, which leads to the activation and proliferation of antigen-specific effector T cells. Depending on the microenvironment, $CD4^+$ cells differentiate into effector (Th1, Th2, Tfh, Th17) or regulatory (Treg) cells. Th1 lymphocytes activate macrophages and $CD8^+$ cells through the production of IFN- γ . Macrophages expose intracellular pathogens to lysosomal enzymes as well as metabolites of reactive oxygen and nitrogen species. Cytotoxic $CD8^+$ T cells destroy pathogens through the release of perforin and granzymes, inducing apoptosis of infected cells. Th2 and Tfh cells activate B lymphocytes, initiating the production of antibodies that neutralize the pathogen. Th17 leads to the activation of neutrophils, which are involved in the elimination of extracellular and some intracellular bacteria. Tregs maintain Th1/Th2 balance. The figure is based on the materials published in [49].

ками МНС антиген проходит подготовку в специализированных компартментах клетки. Так, эндогенные белки направляются в протеасому и представляются в комплексе с МНС I для распознавания рецепторами $CD8^+$ Т-клеток. Экзогенные белки расщепляются лизосомными протеазами, включаются в состав МНС II и идентифицируются рецепторами $CD4^+$ Т-клеток, которые принимают участие как в развитии клеточного, так и гуморального ИО [50].

Механизмы уклонения бактерий от ИО, реализуемого за счёт пути МНС II, весьма разнообразны. В частности, *M. tuberculosis* способен противостоять презентации антигена МНС II сразу на нескольких этапах процессинга. Во-первых, они могут блокировать слияние фагосом и лизосом, а во-вторых, изменять состав лизосом за счёт блока протонной помпы, что приведёт к изменению активности ферментов в составе лизосом и снижению эффективности разрушения

уже фагоцитированных бактерий [51–53]. Все указанные изменения в конечном счёте будут препятствовать образованию комплекса бактериальный антиген-МНС II и развитию приобретённого ИО на микобактерии.

Аналогично, *Salmonella typhimurium* способна препятствовать презентации антигена на уровне фагосом [54]. Патогенность сальмонелл зависит от экспрессии генов в регуляторном локусе *rhoP*, снижающих эффективность процессинга МНС II в макрофагах [55], бактерии остаются в увеличенных фагосомах и не подвергаются деградации. В дополнение к этому, *Salmonella* снижает поверхностную экспрессию МНС II с помощью клатрин-зависимого механизма, что приводит к накоплению МНС II в поливезикулярных тельцах без их последующего встраивания в поверхностную мембрану [56].

Escherichia coli снижает экспрессию МНС II и нарушает последующую презентацию антигена путём подавления активатора транскрипции класса II (СИТА) [57]. *M. tuberculosis* также приводит к (TLR2)-зависимому ингибированию экспрессии СИТА, экспрессии молекул МНС II и презентации антигена, соответственно [58].

В дополнение к этому, показано, что термолабильный токсин кишечной палочки влияет на связывание антигена с внутриклеточными молекулами МНС II [59].

РНК *Brucella abortus* и её липопротеины также вносят существенный вклад в подавление экспрессии белков МНС II на поверхности моноцитов и макрофагов, приводя тем самым к опосредованному снижению функциональной активности CD4⁺ Т-клеток [60].

Ещё одним возможным механизмом отрицательной регуляции работы МНС II является воздействие суперантигенов. Например, *Streptococcus pyogenes* имеет ряд суперантигенов (*Spe*, *SSA*, *Sme*), которые обходят классическую презентацию, напрямую связываясь с молекулами МНС II класса АПК, а также со специфическими переменными участками цепи ТКР.

Стоит отметить, что полиморфизм белков МНС II влияет на взаимодействие с суперантигенами. Было показано, что суперантиген *SpeA* преимущественно взаимодействует с аллелями DQ, тогда как *SpeC* — с аллелями DR, вызывая повышенный цитокиновый ответ при БИ [61].

Staphylococcus aureus экспрессирует аналог белка МНС II (*Map*) [62], способный связываться с Fc-областью IgG. В дополнение к этому, *Map* также действует на Т-клетки, снижая их пролиферацию и реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Баланс сдвигается в сторону Th2-лимфоцитов, что снижает эффективность иммунной защиты из-за дефицита Th1 клеток и слабого рекрутинга нейтрофилов за счёт взаимодействия с ICAM-1 [62].

Влияние бактерий на экспрессию, процессинг и презентацию антигена по пути МНС I

Нарушения презентации антигенов молекулами МНС I при БИ менее распространены [63]. Однако было показано, что белок PPE38 *M. tuberculosis* способен подавлять экспрессию МНС I на поверхности макрофагов, а также уменьшать количество CD8⁺ Т-лимфоцитов в печени, селезёнке и лёгких заражённых животных [64].

B. abortus, используя TLR8-зависимый механизм и сигнальный путь EGFR подавляет ИФН-γ-индуцированную экспрессию МНС I на поверхности моноцитов и макрофагов человека. Таким образом, бактерии рода *Brucella* могут скрываться внутри инфицированных клеток и избегать ИО хозяина [65].

Экспериментальные исследования на мышах с дефицитом перекрёстного представления (процесс при котором антигены, обычно представляемые молекулами МНС II, могут быть представлены также и молекулами МНС I класса) показали, что после инфицирования *Listeria monocytogenes* у животных была нарушена способность генерировать антиген-специфические CD8 Т-клетки для индукции цитотоксического клеточного ответа, рестриктированного по антигенам МНС I класса [66].

Кроме того, экспрессия МНС I снижается при некоторых БИ (вызванных представителями родов *Salmonella*, *Yersinia* и *Klebsiella*) у пациентов с генотипом HLA-B27 [67], по-видимому, вследствие внутриклеточного удержания МНС I. Напротив, заражение макрофагов *E. coli* [68] не приводило к снижению экспрессии МНС I, а даже несколько увеличивало её. В другом исследовании, A. Olsén и соавт. [69] показали, что *E. coli*, содержащая поверхностные фимбрии (*curli*), связывает растворимые матричные белки и белки МНС I, способствуя адгезии и колонизации патогена в тканях хозяина.

Терапия инфекционных заболеваний за счёт воздействия на пути МНС I и МНС II

При терапии БИ за счёт воздействия на ИО одним из перспективных подходов является изменение естественного пути, силы, скорости процессинга и презентации антигена.

Процессинг антигена по пути МНС II проходит в несколько этапов. Сначала экзогенные белки с помощью эндоцитоза направляются в лизосомы, далее они расщепляются кислыми протеазами и

затем включаются в состав молекул МНС II. Структура пептида в рамках данного процесса должна быть чётко определена, поскольку он является неотъемлемой частью молекулы МНС, участвует в её конформационных изменениях [70] и, как итог, приводит к стабилизации всего комплекса МНС-пептид. Только стабильные структуры МНС-пептид транспортируются и далее представляются на поверхности клетки. Потеря пептида из-за слабых взаимодействий или связывание локально доступных пептидов вне клетки пустыми молекулами МНС может привести к неэффективной презентации антигена [71]. В связи с этим, повышение стабильности комплекса МНС II-пептид является возможным подходом для улучшения презентации антигена в составе белков МНС II.

В своей работе F. Chen и соавт. [72] показали, что иммуногены, несущие участки инвариантной цепи (Ii) совместно с мультиэпитопом белка вируса болезни Ньюкасла (F306), способствуют повышению специфического ИО за счёт устойчивого взаимодействия иммуногена с молекулой МНС II за пределами её пептид-связывающего домена, приводя к образованию относительно стабильных комплексов МНС II-пептид на поверхности мембраны клетки с дальнейшей трансдукцией сигнала. Кроме того, введение таких структур экспериментальным животным выявило у них образование высоких титров антител. Таким образом, изменение структуры антигена стало причиной конформационных изменений самой молекулы МНС II, что выражалось в формировании стабильных комплексов МНС II-пептид, необходимых для их дальнейшей презентации Т-клеткам.

Как было установлено в опытах *in vitro* и *in vivo*, иммуногены на основе аденовируса, экспрессирующие химеру цепи Ii совместно с гликопротеином вируса лимфоцитарного хориоменингита (LcMV), повышали активность CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Кроме того, мыши с введением данной плазмиды не погибали после их инфицирования летальной дозой вируса хориоменингита [73].

В случае процессинга антигена по пути МНС I, белок, синтезированный в клетке, расщепляется протеасомой. Далее короткие пептиды переносятся белками-транспортёрами в эндоплазматический ретикулум (ЭР), где они связываются с МНС I. Затем, комплекс МНС I-пептид транспортируется на поверхность клетки для распознавания рецепторами CD8⁺ Т-клеток [74]. В этой связи, усиление направления белков в протеасому или ЭР должно способствовать большей доступности пептидов для их представления и дальнейшей презентации в комплексе с МНС I.

Для деградации большинства белков в протеасомах требуется их убиквитинирование. Показано, что добавление убиквитин-кодирующей последовательности на 5'-конец целевого гена

делало антиген ещё более подходящим субстратом для протеасомы. Так, добавление молекулы убиквитина на N-конец синтетического белка, состоящего из CTL-эпитопов ВИЧ, привело к усилению иммуногенности сконструированного антигена на клеточном уровне [75].

Сигналом к протеасомной деградации может служить также и неправильная укладка белка. В работе P. O. Pyinskii и соавт. [76] были сконструированы варианты белков вируса гриппа M1 и NS1 с разрушенной трёхмерной структурой. Иммунизация «деструктурированными» полипептидами приводила к значительно более выраженному цитотоксическому ответу, чем иммунизация исходными белками [76].

Описанные работы были сфокусированы на модификации структуры пептида, что приводило к опосредованному воздействию на пути процессинга белков МНС.

Одним из перспективных подходов, на наш взгляд, является воздействие на молекулы МНС, например, за счёт использования антител. Действительно, применение моноклональных антител [77, 78] и их влияние на связывание с молекулами МНС были описаны в работе [79]. Тем не менее, применение антител в клинической практике до сих пор ограничено проблемами, связанными с их стабильностью, рядом побочных эффектов и стоимостью подобной терапии [80, 81].

Преодолеть такие ограничения можно в том числе при использовании сверхвысоких разведений (СВР) антител. Технологическая платформа, основанная на физическом воздействии на растворы антител в ходе последовательного разведения исходной субстанции антител до получения СВР, успешно используется для производства группы безопасных и эффективных препаратов для лечения различных заболеваний [82, 83], включая инфекционные [84]. Было показано, что СВР обладают рядом особенностей, характерных для нелинейной системы: во-первых, получаемые «условные» разведения приобретают особые длительно сохраняющиеся физико-химические и биологические свойства, отличные как от свойств исходного вещества, так и от свойств исходного растворителя (воды) [85–87]; во-вторых, появились данные, свидетельствующие о возможности сохранения молекул даже в СВР, что может быть обусловлено эффектом флотации [88, 89]. Однако, вероятно, «носителем» активности, определяющей особые физико-химические и биологические свойства, в них являются спонтанно формирующиеся наноассоциаты [86, 90]. В практическом отношении наиболее важным из свойств СВР является их способность модифицировать активность исходного вещества [91]. Установлено, что механизм действия заключается в конформационных изменениях своей мишени, которые как следствие,

вливают на процессы, в которые вовлечена данная мишень в организме [91]. В недавно опубликованном исследовании [92] было показано, что препарат на основе СВР антител к ИФН-γ (СВР АТ к ИФН-γ) вызывает конформационные изменения в молекуле ИФН-γ, которые имеют решающее значение для функции белка-мишени, о чём свидетельствовали выявленные биологические эффекты СВР АТ к ИФН-γ. Физический механизм реализации данного эффекта был изучен методом терагерцовой спектроскопии и молекулярных симуляций и опубликован в работе проф. К. N. Woods [93]. Кроме того, есть данные, свидетельствующие о том, что эффект СВР АТ может быть обусловлен их воздействием на свою мишень без непосредственного с ней контакта [94].

Таким образом, использование СВР АТ к МНС также потенциально может инициировать конформационные модификации белка, которые будут способствовать усилению презентации антигена в комплексе с молекулами МНС и в конечном итоге, способствовать протективному эффекту в отношении различного рода инфекций, в том числе и бактериального генеза.

При проверке выдвинутой гипотезы с использованием мышиных моделей гриппозной и смешанной вирусно-бактериальной пневмонии было показано, что СВР АТ к МНС II, в составе комплексного препарата, и СВР АТ к МНС I защищали животных от гибели и снижали проявление основных симптомов инфекций [93]. Подобный эффект для СВР АТ к МНС I и МНС II наблюдали также при заражении цыплят *Salmonella enteritidis* rif^r92. С введением экспериментального препарата инфекционный процесс проходил в более лёгкой форме, бактериальная нагрузка была ниже, обсеменённость помёта уменьшалась на два порядка по сравнению с соответствующим контролем [94]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* был изучен один из потенциальных механизмов действия СВР АТ к МНС II [95]. Так, было показано, что при введении СВР АТ к МНС II в лунки планшетов, содержащих незрелые ДК, уровень экспрессии маркера их созревания CD83 был значимо выше по сравнению с контрольной группой клеток. Более того, продукция провоспалительных (ИЛ-6, ИЛ-12 и ИЛ-23) и противовоспалительного (ИЛ-10) цитокинов была также выше в случае применения СВР АТ к МНС II [94].

Полученные экспериментальные данные согласуются с выдвинутой нами гипотезой о возможности влияния на молекулы и сигналинг МНС. Стоит отметить, что роль молекул МНС не ограничивается их антигенпрезентирующей функцией, было показано что эти пептиды способны вызывать пролиферацию и созревание ДК за счёт активации тирозинкиназ семейства Syk [96]. Кроме того, было выявлено, что белки МНС II вовлечены

и в активацию семейства протеинкиназ C, вызывающих, напротив, гибель клеток [97].

Таким образом, передача сигналов через молекулы МНС приводят к двоякому эффекту: с одной стороны — инициации иммунного ответа, а с другой — его подавлению. Такое многообразие эффектов позволяет рассмотреть передачу сигналов и сами молекулы МНС в качестве инструмента контроля презентации иммуногена. В дальнейшем это свойство может быть использовано при создании абсолютно новых эффективных профилактических и терапевтических мер в терапии БИ.

Заключение

Ввиду регулярного появления новых случаев множественной лекарственной устойчивости бактерий, поиск и разработка новых АБП по-прежнему необходимы. Возможным вариантом преодолеть замкнутый цикл «разработка–устойчивость–разработка нового препарата» является смещение акцента действия антибактериальной терапии с патогена на усиление защитных свойств иммунной системы хозяина. Молекулы МНС, играющие ключевую роль в защите от возбудителей инфекционных заболеваний, представляются уникальной мишенью для терапии БИ, в том числе в составе комплексного лечения совместно с антибиотиком. Мы полагаем, что воздействие на белки МНС за счёт конформационных изменений является многообещающим подходом в терапии БИ. Внедрение подобного рода препаратов станет существенным прорывом в лечении различных вариантов бактериальных инфекций.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявили о следующих потенциальных конфликтах интересов в связи с исследованием, авторством и/или публикацией этой статьи: Петрова Н. В., Емельянова А. Г., Ковальчук А. Л., Тарасов С. А. являются сотрудниками ООО «НПФ МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» (полностью или частично). Различные технологические версии сверхвысоких разведений антител являются активными фармацевтическими ингредиентами (отдельно или в качестве одного из компонентов) коммерческих препаратов, которые производит или производит и продаёт ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ». Авторы полностью раскрыли эти интересы журналу «Антибиотики и химиотерапия».

Участие авторов. Петрова Н. В. — поиск и отбор публикаций, анализ данных литературы, обеспечение достоверности результатов, написание рукописи; Емельянова А. Г. и Ковальчук А. Л. — подготовка рукописи и рецензия окончательного текста статьи; Тарасов С. А. — рецензия оконча-

тельного текста статьи. Все сотрудники прочли и одобрили окончательную версию рукописи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Литература/References

1. Belete T.M. Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. *Hum Microbiome J.* 2019; 11: 100052. doi: 10.1016/j.humic.2019.01.001.
2. Brown E.D., Wright G.D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature.* 2016; 529 (7586): 336–343. doi: 10.1038/nature17042.
3. World Health Organization (WHO). 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. 2021. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>
4. Butler M.S., Paterson D.L. Antibiotics in the clinical pipeline in October 2019. *J Antibiot (Tokyo).* 2020; 73 (6): 329–364. doi: 10.1038/s41429-020-0291-8.
5. Koo H., Allan R.N., Howlin R.P., Stoodley P., Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2017; 15 (12): 740–755. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99.
6. Ortines R.V., Liu H., Cheng L.I., Cohen T.S., Lawlor H., Gami A. et al. Neutralizing Alpha-Toxin Accelerates Healing of *Staphylococcus aureus*-Infected Wounds in Nondiabetic and Diabetic Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62 (3): e02288–17. doi: 10.1128/AAC.02288-17.
7. Андрюков Б.Г., Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Бынина М.П. Бактериальные токсин-антитоксикозные системы и новые стратегии создания антибактериальных препаратов. Антибиотики и химиотерапия. 2018; 63 (3–4): 50–58. [Andryukov B.G., Besednova N.N., Zaporozhets T.S., Bynina M.P. Bacterial Toxin-Antitoxin Systems and New Strategies for Creating Antibacterial Preparations. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2018; 63 (3–4): 50–58. (in Russian)]
8. Buroni S., Chiarelli L.R. Antivirulence compounds: a future direction to overcome antibiotic resistance? *Future Microbiol.* 2020; 15: 299–301. doi: 10.2217/fmb-2019-0294.
9. Zurawski D.V., McLendon M.K. Monoclonal Antibodies as an Antibacterial Approach Against Bacterial Pathogens. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9 (4): 155. doi: 10.3390/antibiotics9040155.
10. Handel A., Margolis E., Levin B.R. Exploring the role of the immune response in preventing antibiotic resistance. *J Theor Biol.* 2009; 256 (4): 655–662. doi: 10.1016/j.jtbi.2008.10.025.
11. Netea M.G., Kullberg B.J., Van der Meer J.W. Proinflammatory cytokines in the treatment of bacterial and fungal infections. *BioDrugs.* 2004; 18 (1): 9–22. doi: 10.2165/00063030-200418010-00002.
12. Cardona P.J. RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb).* 2006; 86 (3–4): 273–289. doi: 10.1016/j.tube.2006.01.024.
13. Bourinbaia A.S., Batbold U., Efremenko Y., Sanjagdorj M., Butov D., Damdinpurev N. et al. Phase III, placebo-controlled, randomized, double-blind trial of tableted, therapeutic TB vaccine (V7) containing heat-killed. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 2020; 18: 100141. doi: 10.1016/j.jctube.2019.100141.
14. Райт А.Е. Основы вакцинотерапии (теория опсонинной). Спб.: 1908. [Rajt A.E. Osnovy vaktsinoterapii (teoriya opsoninoj). Spb.: 1908. (in Russian)]
15. Brötz-Oesterhelt H., Sass P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. *Future Microbiol.* 2010; 5 (10): 1553–1579. doi: 10.2217/fmb.10.119.
16. Souza-Fonseca-Guimaraes E., Adib-Conquy M., Cavaillon J.M. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol Med.* 2012; 18: 270–285. doi: 10.2119/molmed.2011.00201.
17. Janeway C.A. Jr., Travers P., Walport M. et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science. 2001. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>
18. Uribe-Querol E., Rosales C. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Front Immunology.* 2017; 8: 1368. doi: 10.3389/fimmu.2017.01368.
19. Shepherd F.R., McLaren J.E. T Cell Immunity to Bacterial Pathogens: Mechanisms of Immune Control and Bacterial Evasion. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (17): 6144. doi: 10.3390/ijms21176144.
20. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8 (1): 34–47. doi: 10.1038/nri2206.
21. Reddy K.V., Yedery R.D., Aranha C. Antimicrobial peptides: promises and promises. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24 (6): 536–47. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005.
22. Diamond G., Beckloff N., Weinberg A., Kisich K.O. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des.* 2009; 15 (21): 2377–2392. doi: 10.2174/138161209788682325.
23. Zhang L.J., Gallo R.L. Antimicrobial peptides. *Curr Biol.* 2016; 26 (1): R14–9. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.017.
24. Ma J.Y., Shao S., Wang G. Antimicrobial peptides: bridging innate and adaptive immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Chin Med J (Engl).* 2020; 133 (24): 2966–2975. doi: 10.1097/CM9.0000000000001240.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Е. М. Ржавиной и К. К. Ганиной за участие в обсуждении и предоставлении рекомендаций при подготовке статьи.

25. Niyonsaba F., Iwabuchi K., Matsuda H., Ogawa H., Nagaoka I. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol.* 2002; 14 (4): 421–6. doi: 10.1093/intimm/14.4.421.
26. Scott M.G., Davidson D.J., Gold M.R., Bowdish D., Hancock R.E. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol.* 2002; 169 (7): 3883–3891. doi: 10.1093/intimm/14.4.421.
27. Tjabringa G.S., Aarbiou J., Ninaber D.K., Drijfhout J.W., Sørensen O.E., Borregaard N. et al. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol.* 2003; 171 (12): 6690–6696. doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6690.
28. Nagaoka I., Tamura H., Hirata M. An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *J Immunol.* 2006; 176 (5): 3044–3052. doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3044.
29. Aarbiou J., Tjabringa G.S., Verhoosel R.M., Ninaber D.K., White S.R., Peltenburg L.T. et al. Mechanisms of cell death induced by the neutrophil antimicrobial peptides alpha-defensins and LL-37. *Inflamm Res.* 2006; 55 (3): 119–127. doi: 10.1007/s00011-005-0062-9.
30. Barlow P.G., Li Y., Wilkinson T.S., Bowdish D.M., Lau Y.E., Cosseau C. et al. The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *J Leukoc Biol.* 2006; 80 (3): 509–20. doi: 10.1189/jlb.1005560.
31. Kosikowska P., Lesner A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). *Expert Opin Ther Pat.* 2016; 26 (6): 689–702. doi: 10.1080/13543776.2016.1176149.
32. Marr A.K., Gooderham W.J., Hancock R.E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol.* 2006; 6 (5): 468–472. doi: 10.1016/j.coph.2006.04.006.
33. Moloney M.G. Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. *Trends Pharmacol Sci.* 2016; 37 (8): 689–701. doi: 10.1016/j.tips.2016.05.001.
34. Hassan S.S., Akram M., King E.C., Dockrell H.M., Cliff J.M. PD-1, PD-L1 and PD-L2 gene expression on t-cells and natural killer cells declines in conjunction with a reduction in PD-1 protein during the intensive phase of tuberculosis treatment. *PLoS One.* 2015; 10 (9): e0137646. doi: 10.1371/journal.pone.0137646.
35. Bandaru A., Devalraju K.P., Paidipally P., Dhiman R., Venkatasubramanian S., Barnes P.F. et al. Phosphorylated STAT3 and PD-1 regulate IL-17 production and IL-23 receptor expression in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol.* 2014; 44 (7): 2013–2024. doi: 10.1002/eji.201343680.
36. Trinchieri G., Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7 (3): 179–190. doi: 10.1038/nri2038.
37. Muñoz N., Van Maele L., Marqués J.M., Rial A., Sirard J.C., Chabalgoity J.A. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun.* 2010; 78 (10): 4226–4233. doi: 10.1128/IAI.00224-10.
38. Yu F.S., Cornicelli M.D., Kovach M.A., Newstead M.W., Zeng X., Kumar A. et al. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *J Immunol.* 2010; 185 (2): 1142–1149. doi: 10.4049/jimmunol.1000509.
39. Zaheer S.A., Mukherjee R., Ramkumar B., Misra R.S., Sharma A.K., Kar H.K. et al. Combined multidrug and *Mycobacterium w* vaccine therapy in patients with multidrug-resistant leprosy. *J Infect Dis.* 1993; 167 (2): 401–410. doi: 10.1093/infdis/167.2.401.
40. Johnston H.M. Gamma Interferon: From Antimicrobial Activity to Immune Regulation. *Front Immunol.* 2015; 5: 667. doi: 10.3389/fimmu.2014.00667.
41. Vecchié A., Bonaventura A., Toldo S., Dagna L., Dinarello C.A., Abbate A. IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies? *J Cell Physiol.* 2021; 236 (3): 1638–1657. doi: 10.1002/jcp.30008.
42. Quezada G., Koshkina N.V., Zweidler-McKay P., Zhou Z., Kontoyiannis D.P., Kleiner E.S. Intranasal granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reduces the *Aspergillus* burden in an immunosuppressed murine model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (2): 716–718. doi: 10.1128/AAC.00760-07.
43. Chen T.K., Groncy P.K., Javahery R., Chai R.Y., Nagpala P., Finkelman M. et al. Successful treatment of *Aspergillus* ventriculitis through voriconazole adaptive pharmacotherapy, immunomodulation, and therapeutic monitoring of cerebrospinal fluid (1→3)-β-D-glucan. *Med Mycol.* 2017; 55 (1): 109–117. doi: 10.1093/mmy/myw118.
44. Ulm H., Wilmes M., Shai Y., Sahl H.G. Antimicrobial host defensins — specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Front Immunol.* 2012; 3: 249. doi: 10.3389/fimmu.2012.00249.
45. Włodarczyk M., Druszczyńska M., Fol M. Trained Innate Immunity Not Always Amicable. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (10): 2565. doi: 10.3390/ijms20102565.

46. Eisen H.N., Chakraborty A.K. Evolving concepts of specificity in immune reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (52): 22373–22380. doi: 10.1073/pnas.1012051108.
47. US Committee on New Directions in the Study of Antimicrobial Therapeutics: Immunomodulation. Treating Infectious Diseases in a Microbial World: Report of Two Workshops on Novel Antimicrobial Therapeutics. Washington (DC): National Academies Press (US); 2006. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19846/>
48. Bartl S., Baish M., Weissman I.L., Diaz M. Did the molecules of adaptive immunity evolve from the innate immune system? *Integr Comp Biol*. 2003; 43 (2): 338–46. doi: 10.1093/icb/43.2.338.
49. Immunity to Infection. In: Mak T.W., Saunders M.E., Jett B.D., ed. *Primer to the Immune Response*. Academic Cell; 2014; 295–333 II.
50. Kotsias E., Cebrian I., Alloatti A. Antigen processing and presentation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019; 348: 69–121. doi: 10.1016/bs.ircmb.2019.07.005.
51. Ramachandra L., Noss E., Boom W.H., Harding C.V. Processing of Mycobacterium tuberculosis antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *J Exp Med*. 2001; 194 (10): 1421–1432. doi: 10.1084/jem.194.10.1421.
52. Sturgill-Koszycki S., Schlesinger P.H., Chakraborty P., Haddix P.L., Collins H.L., Fok A.K. et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 1994; 263 (5147): 678–681. doi: 10.1126/science.8303277.
53. Fratti R.A., Vergne J., Chua J., Skidmore J., Deretic V. Regulators of membrane trafficking and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation block. *Electrophoresis*. 2000; 21 (16): 3378–3385. doi: 10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3378::AID-ELPS3378>3.0.CO;2-B.
54. Cheminay C., Möhlenbrink A., Hensel M. Intracellular Salmonella inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*. 2005; 174 (5): 2892–2899. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2892.
55. Mitchell E.K., Mastroeni P., Kelly A.P., Trowsdale J. Inhibition of cell surface MHC class II expression by Salmonella. *Eur J Immunol*. 2004; 34 (9): 2559–2267. doi: 10.1002/eji.200425314.
56. Jackson N.P., Kang Y.H., Lapaque N., Janssen H., Trowsdale J., Kelly A.P. Salmonella polarises peptide-MHC-II presentation towards an unconventional Type B CD4+ T-cell response. *Eur J Immunol*. 2013; 43 (4): 897–906. doi: 10.1002/eji.201242983.
57. Barbaro A.D.L., Tosi G., Frumento G., Bruschi E., D'Agostino A., Valle M.T. et al. Block of Stat-1 activation in macrophages phagocytosing bacteria causes reduced transcription of CIITA and consequent impaired antigen presentation. *Eur J Immunol*. 2002; 32 (5): 1309–1318. doi: 10.1002/1521-4141(200205)32:5<1309::AID-IMMU1309>3.0.CO;2-4.
58. Harding C.V., Boom W.H. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8 (4): 296–307. doi: 10.1038/nrmicro2321.
59. Bignon A., Watt A.P., Linternman M.A. Escherichia coli heat-labile enterotoxin B limits T cells activation by promoting immature dendritic cells and enhancing regulatory T cell function. *Front Immunology*. 2017; 8: 560. doi: 10.3389/fimmu.2017.00560.
60. Milillo M.A., Trotta A., Serafino A., Marin Franco J.L., Marinho F.V., Alcain J. et al. Bacterial RNA Contributes to the Down-Modulation of MHC-II Expression on Monocytes/Macrophages Diminishing CD4. *Front Immunol*. 2019; 10: 2181. doi: 10.3389/fimmu.2019.02181.
61. Norrby-Teglund A., Nepom G.T., Kotb M. Differential presentation of group A streptococcal superantigens by HLA class II DQ and DR alleles. *Eur J Immunol*. 2002; 32 (9): 2570–2577. doi: 10.1038/nrmicro2321.
62. Lee L.Y., Miyamoto Y.J., McIntyre B.W., Höök M., McCrea K.W., McDevitt D. et al. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest*. 2002; 110 (10): 1461–1471. doi: 10.1172/JCI16318.
63. Hornef M.W., Wick M.J., Rhen M., Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2002; 3 (11): 1033–1040. doi: 10.1038/nri1102-1033.
64. Meng L., Tong J., Wang H., Tao C., Wang Q., Niu C. et al. PPE38 protein of Mycobacterium tuberculosis inhibits macrophage MHC class I expression and dampens CD8+ T Cell Responses. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 68. doi: 10.3389/fcimb.2017.00068.
65. Milillo M.A., Velásquez L.N., Trotta A., Delpino M.V., Marinho F.V., Balboa L. et al. B. abortus RNA is the component involved in the down-modulation of MHC-I expression on human monocytes via TLR8 and the EGFR pathway. *PLoS Pathog*. 2017; 13 (8): e1006527. doi: 10.1371/journal.ppat.1006527.
66. Reinicke A.T., Omilusik K.D., Basha G., Jefferies W.A. Dendritic cell cross-priming is essential for immune responses to *Listeria monocytogenes*. *PLoS One*. 2009; 4 (10): e7210. doi: 10.1371/journal.pone.0007210.
67. Kirveskari J., He Q., Leirisaalo-Repo M., Mäki-Ikola O., Wuorela M., Putton-Laurila A. et al. Enterobacterial infection modulates major histocompatibility complex class I expression on mononuclear cells. *Immunology*. 1999; 97 (3): 420–428. doi: 10.1046/j.1365-2567.1999.00803.x.
68. Tobian A.A., Potter N.S., Ramachandra L., Pai R.K., Convery M., Boom W.H. et al. Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2003; 171 (3): 1413–1422. doi: 10.4049/jimmunol.171.3.1413.
69. Olsén A., Wick M.J., Mörgelin M., Björck L. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun*. 1998; 66 (3): 944–949. doi: 10.1128/IAI.66.3.944-949.1998.
70. Wiecek M., Abualrous E.T., Sticht J., Álvaro-Benito M., Stolzenberg S., Noé F., Freund C. et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *Front Immunology*. 2017; 8: 292. doi: 10.3389/fimmu.2017.00292.
71. Pieters J. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 1997; 9 (1): 89–96. doi: 10.1016/s0952-7915(97)80164-1.
72. Chen F., Meng F., Pan L., Xu F., Liu X., Yu W. Boosting immune response with the invariant chain segments via association with non-peptide binding region of major histocompatibility complex class II molecules. *BMC Immunol*. 2012; 13: 55. doi: 10.1186/1471-2172-13-5.
73. Holst P.J., Sorensen M.R., Mandrup Jensen C.M., Orskov C., Thomsen A.R., Christensen J.P. MHC class II-associated invariant chain linkage of antigen dramatically improves cell-mediated immunity induced by adenovirus vaccines. *J Immunol*. 2008; 180 (5): 3339–3346. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.3339.
74. Стародубова Е.С., Исгуляниц М.Г., Карпов В.Л. Регуляция процессинга иммуногена: сигнальные последовательности и их использование для создания нового поколения ДНК-вакцин. *Acta Naturae*. 2010; 2 (1): 59–65. [Starodubova E.S., Isagulians M.G., Karpov V.L. Regulatsiya protsessinga immunogena: signalnye posledovatel'nosti i ih ispol'zovanie dlya sozdaniya novogo pokoleniya dnk-vaktsin. *Acta Naturae*. 2010; 2 (1): 59–65. (in Russian)]
75. Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I. et al. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. *Vaccine*. 2004; 22 (13–14): 1672–1682. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.09.048.
76. Ilyinskii P.O., Meriin A.B., Gabai V.L., Zhirnov O.P., Thoidis G., Shneider A.M. Prime-boost vaccination with a combination of proteasome-degradable and wild-type forms of two influenza proteins leads to augmented CTL response. *Vaccine*. 2008; 26 (18): 2177–2185. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.02.050.
77. Høydahl L.S., Frick R., Sandlie I., Løset G. Targeting the MHC Ligandome by Use of TCR-Like Antibodies. *Antibodies (Basel)*. 2019; 8 (2): 32. doi: 10.3390/antib8020032.
78. Stone J.D., Harris D.T., Kranz D.M. TCR affinity for p/MHC formed by tumor antigens that are self-proteins: impact on efficacy and toxicity. *Curr Opin Immunol*. 2015; 33: 16–22. doi: 10.1016/j.coi.2015.01.003.
79. Høydahl L.S., Frick R., Sandlie I., Løset G. Targeting the MHC Ligandome by Use of TCR-Like Antibodies. *Antibodies (Basel)*. 2019; 8 (2): 32. doi: 10.3390/antib8020032.
80. Santos M.L.d., Quintilio W., Manieri T.M., Tsuruta L.R., Moro A.M. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Braz J Pharma Sci*. 2018; 54 (spe): e01007. doi: 10.1590/s2175-9790201800001007.
81. Sifnitiotis V., Cruz E., Eroglu B., Kayser V. Current advancements in addressing key challenges of therapeutic antibody design, manufacture, and formulation. *Antibodies (Basel)*. 2019; 8 (2): 36. doi: 10.3390/antib8020036.
82. Mkrtumyan A., Romantsova T., Vorobiev S. et al. Efficacy and safety of Subetta add-on therapy in type 1 diabetes mellitus: The results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018; 142: 1–9. doi: 10.1016/j.diabres.2018.04.044.
83. Pushkar D., Vinarov A., Spivak L. et al. Efficacy and safety of Afalaza in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia at risk of progression: a multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Cent European J Urol*. 2018; 71 (4): 427–435. doi: 10.5173/cej.2018.1803.
84. Rafalsky V., Averyanov A., Bart B. et al. Efficacy and safety of Ergoferon versus oseltamivir in adult outpatients with seasonal influenza virus infection: a multicenter, open-label, randomized trial. *Int J Infect Dis*. 2016; 51: 47–55. doi: 10.1016/j.ijid.2016.09.002.
85. Gudkov S.V., Penkov N.V., Baimler I.V., Lyakhov G.A., Pustovoy V.I., Simakin A.V. et al. Effect of mechanical shaking on the physicochemical properties of aqueous solutions. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (21): 8033. doi: 10.3390/ijms21218033.
86. Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Киселева Ю.В., Коновалов А.И. Самоорганизация и физико-химические свойства водных растворов антител к интерферону-гамма в сверхвысоком разведении. Доклады Академии наук. 2015; 462 (2): 185–189. doi: 10.1134/S0013250115050048. [Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Y.V. et al. Self-organization and physicochemical properties of aqueous solutions of the antibodies to interferon gamma at ultrahigh dilution. *Dokl Phys Chem*. 2015. 462: 110–114. (in Russian)]
87. Shcherbakov I.A. Influence of External Impacts on the Properties of Aqueous Solutions. *Phys Wave Phen*. 2021; 29: 89–93. doi: 10.3103/S1541308X21020114.
88. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Ninham B.W., Chirikov S.N., Chaikov L.L., Penkov N.V. et al. Shaking-induced aggregation and flotation in immunoglobulin dispersions: differences between water and water-ethanol mixtures. *ACS Omega*. 2020; 5 (24): 14689–14701. doi: 10.1021/acsomega.0c01444.
89. Khramane P.S., Kalita D., Suresh A.K., Kane S.G., Bellare J.R. Why extreme dilutions reach non-zero asymptotes: a nanoparticulate hypothesis based on froth flotation. *Langmuir*. 2012; 28 (45): 15864–15875. doi: 10.1021/la303477s.

90. Lyakhov G., Shcherbakov I.A. Approaches to the physical mechanisms and theories of low-concentration effects in aqueous solutions. *Phys Wave Phen.* 2019; 27 (2): 79–86. doi: 10.3103/S1541308X19020018.
91. Epstein O.I. The Spatial Homeostasis Hypothesis. Review. *Symmetry.* 2018; 10 (4): 103. doi: 10.3390/sym10040103.
92. Tarasov S.A., Gorbunov E.A., Don E.S., Emelyanova A.G., Kovalchuk A.L., et al. Insights into the Mechanism of Action of Highly Diluted Biologics. *J Immunol.* 2020; 205 (5): 1345–1354. doi: 10.4049/jimmunol.2000098
93. Woods K.N. New insights into the microscopic interactions associated with the physical mechanism of action of highly diluted biologics. *Sci Rep.* 2021; 11: 13774. doi: 10.1038/s41598-021-93326-1.
94. Penkov N., Penkova N. Analysis of Emission Infrared Spectra of Protein Solutions in Low Concentrations. *Front Phys.* 2020; 8: 624779. doi: 10.3389/fphy.2020.624779
95. Петрова Н.В., Емельянова А.Г., Тарасов С.А., Картошова Н.П., Глубокова Е. А. Результаты доклинического исследования эффективности экспериментального препарата на основе технологически обработанных антител на моделях гриппа и смешанной вирусно-бактериальной инфекции. *Патогенез.* 2020; 18: 55–63. doi: 10.25557/2310-0435.2020.04.55-63. [Petrova N.V., Emelyanova A.G., Tarasov S.A., Kartashova N.P., Glubokova E.A. Efficacy of an experimental drug based on technologically processed antibodies in models of influenza infection and secondary bacterial pneumonia: results of a preclinical study. *Patogenez.* 2020; 18: 55–63. doi: 10.25557/2310-0435.2020.04.55-63. (in Russian)]
96. Теймуразов М.Г., Петрова Н.В., Карелина Е.А., Ганина К.К., Тарасов С.А., Эпштейн О.И. Доклиническое изучение эффективности нового иммуноотропного препарата при лечении сальмонеллезной инфекции. *Бюллетень сибирской медицины* 2021; 20 (2): 95–101. doi: 10.20538/1682-0363-2021-2-95-101. [Teymurazov M.G., Petrova N.V., Karelina E.A., Ganina K.K., Tarasov S.A., Epstein O.I. Nonclinical study of the new immunotropic drug effectiveness in salmonella infection treatment. *Bull Sib Med.* 2021; 20 (2): 95–101. doi: 10.20538/1682-0363-2021-2-95-101. (in Russian)]
97. Petrova N.V., Emelyanova A.G., Gorbunov E.A., Tarasov S.A. Selected Abstracts From Pharmacology 2020. Induction of dendritic cell maturation by ultra-highly diluted antibodies to MHC class II: *in vitro* results [abstract]. *Br J Pharmacol*; 2020:483-484.
98. Andrae S., Buisson S., Triebel F MHC class II signal transduction in human dendritic cells induced by a natural ligand, the LAG-3 protein (CD223). *Blood.* 2003; 102 (6): 2130-7. doi: 10.1182/blood-2003-01-0273
99. Lim P.S., Sutton C.R., Rao S. Protein kinase C in the immune system: from signaling to chromatin regulation. *Immunology.* 2015; 146 (4): 508–522. doi: 10.1111/imm.12510.

Информация об авторах

Петрова Наталья Владимировна — научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; старший научный сотрудник, ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-2192-7302

Емельянова Александра Геннадиевна — научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; старший научный сотрудник ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-0832-9551

Ковальчук Александр Леонидович — к. м. н., старший научный сотрудник ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-2761-0442

Тарасов Сергей Александрович — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; директор департамента научных исследований и разработок, ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-6650-6958

About the authors

Nataliya V. Petrova — Researcher at the Laboratory of Physiologically Active Substances, Institute of General Pathology and Pathophysiology; senior research associate, Research and Production Company Materia Medica Holding LLC, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2192-7302

Alexandra G. Emelyanova — Researcher at the Laboratory of Physiologically Active Substances, Institute of General Pathology and Pathophysiology; senior research associate, Research and Production Company Materia Medica Holding LLC, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-0832-9551

Alexander L. Kovalchuk — Ph. D. in medicine, Research and Production Company Materia Medica Holding LLC, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-2761-0442

Sergey A. Tarasov — Ph. D. in medicine, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Research and Production Company Materia Medica Holding LLC, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-6650-6958

Обзор рисков контаминации антибиотиками молочной продукции

* Е. Н. ОЛСУФЬЕВА¹, В. С. ЯНКОВСКАЯ², Н. И. ДУНЧЕНКО²

¹ ФГБОУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва, Россия

Overview of the Risks of Antibiotic Contamination of Dairy Products

*EVGENIA N. OLSUFYEVA¹, VALENTINA S. YANKOVSKAYA², NINA I. DUNCHENKO²

¹ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

² Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Резюме

Антибиотики широко применяются в животноводстве для лечения и в кормовых добавках как стимуляторы роста. Антибиотики иногда используются для консервирования продуктов и увеличения сроков хранения в пищевой промышленности. Для тех же целей часто можно встретить фальсификацию антибиотиками сельскохозяйственного сырья и готовой продукции. Через животных антибиотики могут попадать в пищу. Среди продуктов питания молоко и молочные продукты занимают важное место, особенно они необходимы для подрастающего поколения. В настоящее время антибиотики рассматриваются как серьёзный фактор контаминации пищевой продукции и источника формирования антибиотикорезистентности и пищевых аллергий. Мировая общественность обеспокоена проблемой, которая связана с неуклонным развитием устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым лекарственным препаратам. По экспертным оценкам, из-за резистентности патогенных микроорганизмов ежегодно в мире умирают около 700 тыс. человек. В результате проблема отрицательного воздействия антибиотиков на человека становится чрезвычайно важной. В разных странах, в ВОЗ, ВТО, ЕАЭС, в которые входит и РФ, принимаются нормативные документы и специальные законы, ограничивающие применение антибиотиков в аграрно-промышленном комплексе. Проблема изучения рисков контаминации антибиотиками пищевой и молочной продукции является актуальной задачей. Настоящий обзор посвящён оценке рисков контаминации антибиотиками молока и молочных продуктов. Будет рассмотрена группа антибиотиков, которые являются наиболее значимыми с точки зрения наибольшей опасности их присутствия в молочных продуктах для здоровья человека.

Ключевые слова: антибиотики; контаминация; антибиотикорезистентность; молоко; молочная промышленность; аграрно-промышленный комплекс; безопасность продуктов питания

Для цитирования: Олсуфьева Е. Н., Янковская В. С., Дунченко Н. И. Обзор рисков контаминации антибиотиками молочной продукции. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 7–8: 82–96. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-82-96>.

Abstract

Antibiotics are widely used in animal husbandry for livestock treatment, as well as in feed additives, as growth promoters. Antibiotics are sometimes used to preserve food and extend shelf life in the food industry. One can often encounter the falsification of agricultural raw materials and finished products with antibiotics for the same purposes. Antibiotics can get into food through animals. Milk and dairy products occupy an important place among food products; they are especially necessary for the younger generation. Currently, antibiotics are considered a serious factor in the contamination of food products, as well as a source of antibiotic resistance and food allergies. The international community is concerned about the problem associated with the steady development of pathogenic microorganisms' resistance to the drugs currently in use. According to expert estimates, about 700 thousand people die every year globally due to the resistance of pathogenic microorganisms. As a result, the problem of negative impact of antibiotics on humans becomes crucial. Different countries, the WHO, the WTO, and the EAEU, which includes the Russian Federation, adopt regulations and special laws that limit the use of antibiotics in the agro-industrial complex. Therefore, the problem of studying the risks of contamination of food and dairy products with antibiotics is a pressing matter.

Keywords: antibiotics; contamination; antibiotic resistance; milk; dairy industry; agro-industrial complex; food safety

For citation: Olsufyeva E. N., Yankovskaya V. S., Dunchenko N. I. Overview of the risks of antibiotic contamination of dairy products. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 7–8: 82–96. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-7-8-82-96>.

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: Б. Пироговская, 11, НИИНА, г. Москва, 119021. E-mail: eolsufeva@list.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: B. Pirogovskaya 11, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow. E-mail: eolsufeva@list.ru

Введение: основные проблемы использования антибиотиков в животноводстве

Молоко и продукты его переработки — одни из важнейших источников питания человека. Особенно они необходимы для развития подрастающего поколения. В Российской Федерации в связи с обеспечением продовольственной безопасности страны принят курс на увеличение объёмов, качества и экспортного потенциала производства сельскохозяйственной продукции. «Применение антибиотиков в сельском хозяйстве, как ожидается, увеличится за 20 лет на две трети: с 63,2 тыс. тонн в 2010 г. до 105,6 тыс. тонн в 2030 г.», — заявила глава Роспотребнадзора РФ А. Ю. Попова в интервью «Российской газете». Она отметила, что около половины производимых в мире антибиотиков используется именно в сельском хозяйстве [1]. Кроме того, на российский рынок в больших объёмах поступают продовольственные товары, в частности молочные продукты, из зарубежных стран, включая страны СНГ и ЕС.

В настоящее время выращивание сельскохозяйственных животных происходит в условиях уплотнённого содержания, которое увеличивает иммунную нагрузку на организм животного, что приводит к ухудшению его здоровья и к повышению случаев инфекционных заболеваний бактериальной, грибковой, паразитарной и вирусной этиологии [2]. Животные подвержены многим инфекционным заболеваниям, подвергаются травмированию, нередко им приходится оказывать хирургическую помощь. Поэтому в современном животноводстве применение антимикробных средств неизбежно.

Антибиотики в животноводческом комплексе используются в основном для трёх целей: лечения заболевших животных, профилактики для предотвращения заражения в стаде и в качестве добавки к кормам для ускорения роста с целью баланса полезных/вредных бактерий для улучшения питания [3].

Остаточные количества антибиотиков через дойных коров, подвергшихся лечению антибиотиками, могут переходить в молоко, а затем в молочные продукты. Кроме того, антибиотики в некоторых количествах могут попадать в организм животных и другими независимыми путями. Например, антибиотические вещества, применяемые для защиты растений, могут содержаться в окружающей среде: в кормах, в почве или в воде. Большинство антибиотиков плохо метаболизируется в организме человека и животных, в результате чего от 25 до 75% потребляемых антибактериальных средств без изменений выводится из организма и также попадает вместе с водой в естественную среду. Аналогично коммерческое

производство противомикробных средств обеспечивает значительную часть антропогенных антибиотиков, циркулирующих в биосфере [4].

А поскольку промышленное производство молока, сметаны, творога, сливочного масла и других видов молочной продукции не застраховано от наличия в готовой продукции остаточных примесей антимикробных и других токсичных для организма человека веществ, контроль над присутствием их в молоке-сырье и молочных продуктах имеет важное значение для здоровья людей.

Отрицательное воздействие контаминации антибиотиками молочной продукции

Потребитель низкокачественной или фальсифицированной продукции может быть инфицирован через продукты, которые он употребляет в пищу. Ежегодно в США таким путём инфицируются 48 млн человек, из которых 128 000 подлежат госпитализации, а 3000 случаев заканчиваются летальным исходом [5]. По данным ВОЗ, через молоко человеку могут передаваться возбудители 28 инфекционных заболеваний.

С целью уничтожения патогенной флоры, а также для увеличения сроков годности недобросовестные поставщики молочного сырья могут добавлять антибиотики непосредственно и в само молоко. Присутствие небольших количеств антибиотиков в молоке не снимает эту проблему, а скорее усугубляют её. Даже небольшие количества антибиотиков способны повлиять на процессы микробиологического сквашивания при получении кисломолочной продукции и сыров, и часто ухудшают их качество или вообще делают производство ферментированной продукции невозможным. Особенно это актуально в производстве сыров, поскольку антибиотики негативно влияют на развитие кислотности, и закваска не срабатывает [6]. В результате производители молочной продукции несут значительные финансовые потери [7]. Во избежание экономических потерь при приёме молока на перерабатывающем предприятии обязательно проводят оценку наличия веществ ингибирующих заквасочные культуры. Кроме того, даже при производстве молочных продуктов, в технологии которых не предусмотрено развитие заквасочных культур (питьевые молоко и сливки, мороженое, сгущенное молоко, сухое молоко, сладко-сливочное масло и др.) наличие антибиотиков рассматривается как показатель, указывающий на небезопасную продукцию, т. к. такая продукция может вызвать аллергические реакции у потребителей.

Как в России, так и за рубежом, вопросы разработки критериев оценки безопасности продук-

тов питания и контроль за их соблюдением находится в нормативно-правовом поле, сформированном государством. В частности, за содержание антибиотиков в продуктах питания выше предельно допустимых значений, предусмотрены штрафы и отзыв партии продукции.

Неизбежность применения антибиотиков в агропромышленном комплексе (АПК) и, в частности в молочном животноводстве, приводит к очень серьёзной проблеме — развитию резистентности патогенных микроорганизмов, которое влечёт за собой снижение эффективности противомикробной химиотерапии и увеличение смертности населения планеты от бактериальных инфекций. Не случайно ВОЗ назвала устойчивость к антибиотикам одной из трёх наиболее серьёзных угроз общественному здоровью XXI в. и выделила категории особо высоковирулентных, устойчивых к определённым классам антибиотиков штаммов шести групп бактерий, названной ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.) [8]

В 2017 г. ВОЗ к ним дополнило ещё шесть резистентных патогенов, распространение которых несёт глобальную угрозу человечеству [9]. Особенно тревожно появление клонов граммотрицательных «супербактерий» *Paeruginosa*, *A.baumannii* и *K.pneumoniae* уже с широкой лекарственной устойчивостью к большинству антибиотиков (XDR) или полной (пан-) резистентностью ко всем классам антибиотиков (PDR). В мировом масштабе резистентные бактерии являются возбудителями порядка 15% случаев внутрибольничных инфекций и вызывают свыше 700 000 случаев смерти в год. Согласно прогнозам ВОЗ, к 2050 г. смертность от заболеваний, вызванных резистентными бактериями, может достигнуть 10 млн человек в год.

Большую опасность представляют собой образование патогенными микроорганизмами биоплёнок. Биоплёнки — это многоклеточные сообщества, которые удерживаются вместе самопроизведённой внеклеточной матрицей. Способность образовывать биоплёнки — универсальный атрибут бактерий [10]. При этом резистентность к антибиотикам таких микроорганизмов только усугубляется. Биоплёнки часто образуются у штаммов бактерий группы ESKAPE [11]. Образование биоплёнок в продуктах пищевой промышленности, в частности молочной, является серьёзной проблемой. В результате попадания и (или) развития в продукте патогенных микроорганизмов существует опасность на всех стадиях производства и хранения, что напрямую связано с безопасностью и качеством выпускаемой пищевой продукции [12].

При выведении на российский рынок нового антибактериального препарата чувствительность к нему снижается в течение одного года. Так, например, за период с 2013 по 2016 гг. чувствительность к антимикробным препаратам группы тетрациклинов снизилась — от 52,1 до 67,3%. аминогликозидов — от 11,2 до 41,8%, фторхинолонов — на 27,0% [13]. Действие многих антимикробных препаратов связано с нарушением деятельности определённых биохимических процессов, в частности ферментов или органов, регулирующих их активность. Известно, что у некоторых людей бывают аллергические реакции на антибиотики, особенно пенициллиновой группы. Другой антибиотик — тетрациклин — вызывает необратимые изменения в костях продольного скелета и долговременное потемнение зубной эмали у детей, поэтому запрещён к лечению беременных и детей до 8 лет [14].

В связи с вышеперечисленным, исследования путей контаминации антибиотиками молочных продуктов являются крайне актуальными и необходимыми для снижения рисков контаминации как для теории, так и для практики. На рис. 1 изображено дерево прослеживаемости содержания антибиотиков при производстве творожного продукта [15, 16].

Как видно из рис. 1, в конечный творожный продукт с фруктовым наполнителем антибиотик могут попасть непосредственно через молоко животных (основное сырьё), а также через ингредиенты растительного (переработанное растительное сырьё) и животного происхождения (желатин, сычужный фермент).

Основными причинами присутствия остатков антибиотиков в молоке может быть длительное их использование при лечении, например, мастита коров, а также чрезмерная дозировка и длительный клиренс лекарств, неспособность идентифицировать леченных животных, загрязнённое доильное оборудование.

Кроме того, лечение мастита или других инфекционных заболеваний у коров может быть не эффективно при использовании сравнительно дешёвых антибиотиков первых поколений. В этом случае ветеринар вынужден переходить на более современные и дорогостоящие лекарственные средства, но более действенные против устойчивых патогенов. Однако и к этим препаратам неизбежно в скором времени также может возникнуть резистентность. В результате образуется порочный круг, разорвать который крайне необходимо.

Резюмируя всё вышесказанное, можно сделать вывод о том, что контаминация антибиотиками пищевой продукции рассматривается как весьма вероятный и крайне негативный фактор, несущий экономические потери и способствующий формированию антибиотикорезистентности [17–20].

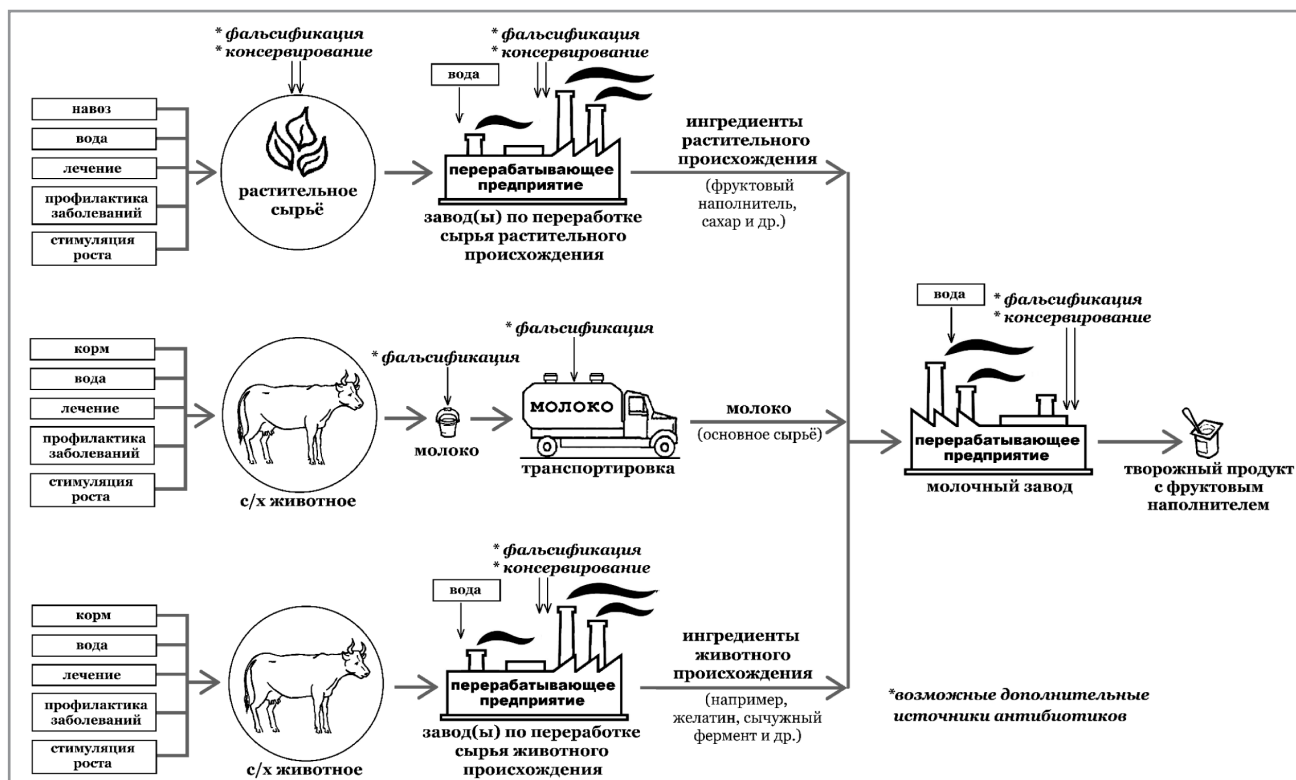


Рис. 1. Дерево прослеживаемости содержания антибиотиков при производстве творожного продукта.
Fig. 1. Traceability tree for antibiotic content in the production of a quark product.

Обзор основных классов антибиотиков как возможных контаминантов молока

Негативное действие антибиотика на организм человека зависит от его физико-химических и биологических свойств и остаточной концентрации в продуктах питания. На рис. 2 представлены основные представители природных антимикробных препаратов как потенциальных примесей молока и молочных продуктов, которые являются обязательными показателями контроля при подтверждении качества и безопасности продукции (табл. 1).

Основными продуцентами подавляющего числа выпускаемых в промышленных масштабах антибиотиков и используемых сегодня в медицине и сельском хозяйстве, являются актиномицеты семейства Streptomycetaceae, грибы и бактерии [21]. Так продуктом вторичного метаболизма биосинтеза актиномицета *S. venezuelae* является антибиотик левомецетин, *S. aureofaciens* — тетрациклин и хлортетрациклин, *S. rimosus* — окситетрациклин и *S. griseus* — стрептомицин и гризин. Грибом *Penicillium chrysogenum* культивируется пенициллин (пенициллин G), а бактериями *Bacillus licheniformis* и *B. erevis* — бацитрацин.

Антибиотики, для которых контроль за содержанием в молоке и молочных продуктах является обязательным требованием (см. табл. 1), представляют собой разные классы природных органических соединений [22]. Помимо четырёх групп антибиотиков (левомецетин, пенициллин, тетрациклины и стрептомицины) нами включены также антибиотики гризин и бацитрацин, которые входят в состав наиболее часто употребляемых кормовых добавок.

Левомецетин. Левомецетин (хлорамфеникол, хлоромецетин) (см. рис. 2) относится к группе фениколов, обладает широким спектром антимикробного действия и применяется для лечения инфекций, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями (*Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*), и крупных вирусов.

Левомецетин — синтетический антибиотик, идентичный природному антибиотику хлорамфениколу, продуцентом которого является актиномицет *S. venezuelae*, выделенный впервые сотрудниками компании Parke-Davis в 1947 г. [23]. В настоящее время левомецетин получают синтетически из 4-нитроацетофенона [24]. В порошке, а также в нейтральных и слабых растворах антибиотик устойчив, но при pH > 10 быстро инактивируется. Левомецетин применяют для лече-

Таблица 1. Антибиотики и допустимые уровни содержания (ДУС) в молоке и молочной продукции
Table 1. Antibiotics and their acceptable levels (ALs) in milk and dairy products

Наименование продукции	Допустимая концентрация антибиотика в молоке и молочных продуктах (мг/кг)					
	Левоми- цетин (хлорамфе- никол)	Пенициллин	Тетрацик- линовая группа	Стрепто- мицины	Гризин	Бацитрацин
Молоко и продукты переработки молока	Не допуска- ется <0,01 <0,0003**	Не допуска- ется <0,004	Не допуска- ется <0,01	Не допуска- ется <0,2	Не допуска- ется <0,5*	Не норми- руется 0,1**
Продукты детского питания***	Не допуска- ется <0,01 <0,0003**	Не допуска- ется <0,004	Не допуска- ется <0,01	Не допуска- ется <0,2	Не допуска- ется <0,5*	Не допуска- ется <0,02**
Кулинарные изделия из рыбы и нерыбных объектов промысла****; для детского питания	Не допуска- ется <0,01 <0,0003**	Не допуска- ется <0,01	Не допуска- ется <0,01	Не допуска- ется <0,2	Не норми- руется	Не допуска- ется

Примечание. * — [19]; ** — [20]; *** — с использованием молочного, мясного и рыбного сырья, а также мяса птицы; **** — для продукта с молочным компонентом.

Note. * — [19]; ** — [20]; *** — with the use of dairy, meat, and fish raw materials, as well as poultry meat; **** — for products with a dairy component.

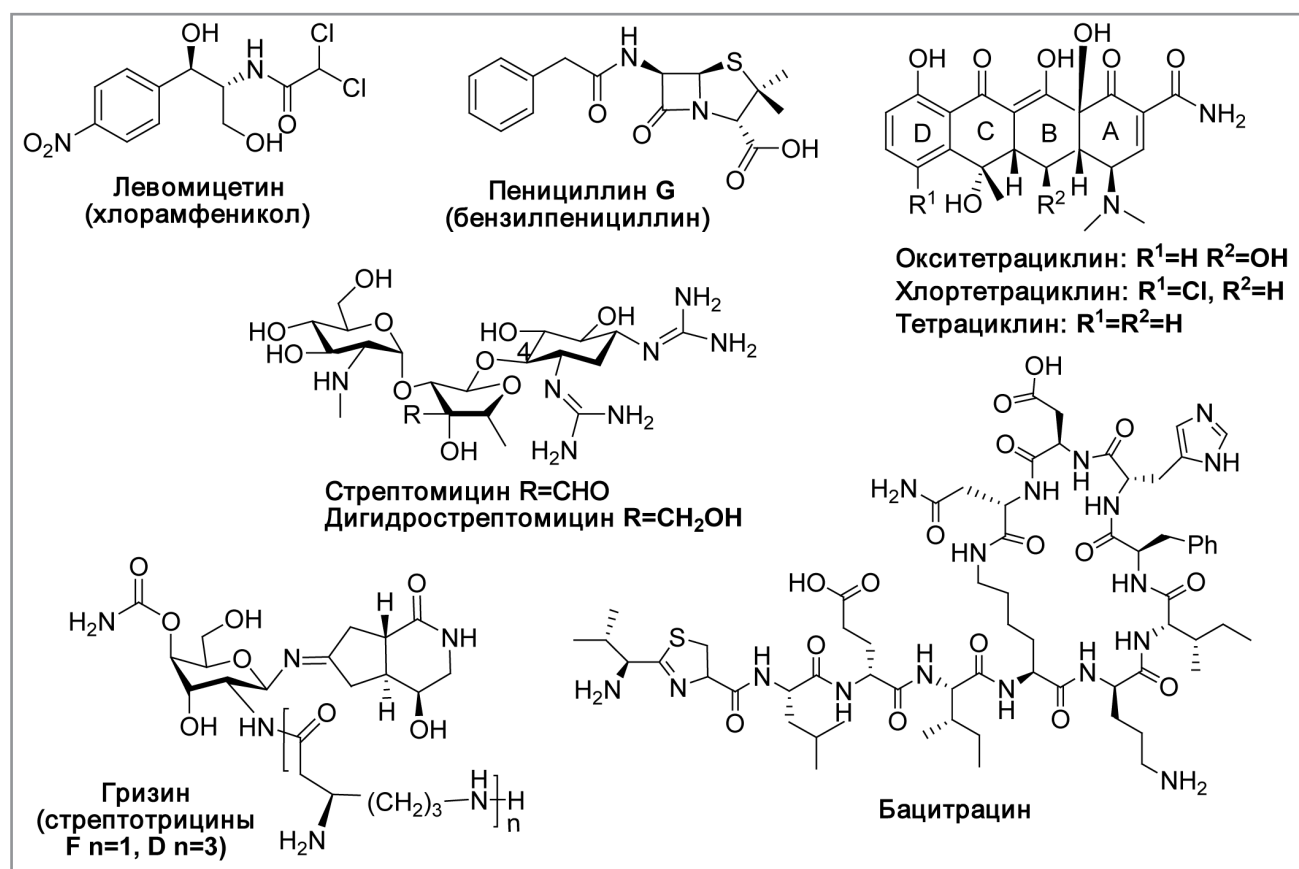


Рис. 2. Структуры природных антибиотиков, необходимых для учета остаточных количеств в молоке и молочных продуктах (к табл. 1).

Fig. 2. Structures of natural antibiotics needed to account for residues in milk and dairy products (to Table 1).

ния сальмонеллёза, колибактериоза, туляремии, гастроэнтерита, бронхопневмонии, менингита и др. в виде инъекций или перорально.

Кроме того, левомицетин применяется наружно, входит в состав мазей синтомицин и ле-

вомеколь. Мазь синтомицина представляет собой линимент с содержанием антибиотика 10%. Природный антибиотик левомицетин по структуре является индивидуальным стереоизомером — ([D-трео-1-(*p*-нитрофенил)-2-дихлорацетила-

мино-1,3-пропандиолом, а смесь D-(-)- и L-(+)-трео-изомеров, полученная синтетически, известная под названием синтомицина, применяется наружно.

Левомиколь содержит 7,5% левомицетина и 40% метилурацила (иммуностимулирующий компонент), который способствует быстрой регенерации тканей. Левомиколь препятствуют гнойному содержимому мешать заживлению раны. Левомиколь назначают при воспалительных процессах гнойного характера, а синтомицин накладывают на раны без содержания гнойных выделений [25].

Левомецитин — бактериостатический антибиотик, который ингибирует пептидный синтез, связываясь с пептидил-трансферазным центром 4V7T рибосомной субчастицы 50S. Блокирование синтеза пептидов приводит к гибели бактерии [26]. Антибиотик токсичен при применении внутрь, устойчивость к левомицетину у микроорганизмов развивается сравнительно медленно [27]. Важным свойством антибиотика является активность в отношении штаммов, устойчивых к пенициллину и стрептомицину.

Пенициллин. Пенициллин (пенициллин G, бензилпенициллин) (см. рис. 2) — природный антибиотик, обладающий широким антимикробным действием. Является первым эффективным лекарством против многих тяжёлых заболеваний, в частности, гангрены, а также инфекций, вызываемых стафилококками и стрептококками.

Является первым антибиотиком, внедрённым в медицину, выделен сначала в виде экстракта в 1929 г. А. Флемингом из гриба *Penicillium chrysogenum* [28]. Практический потенциал пенициллина был раскрыт Г. Флори и Э. Чейном, которые выделили чистый антибиотик и показали его высокую антибактериальную активность в лечении животных и человека [29, 30].

Пенициллин относится к группе бета-лактамов антибиотиков. Это дипептид, сформированный из остатков валина и цистеина, в котором аминокислотная группа ацилирована фенилуксусной кислотой. Механизм антибактериального эффекта пенициллина связан с нарушением работы ферментов, участвующих в построении пептидогликана клеточной стенки бактерий. Эти ферменты ещё называют РВР-белками (penicillin binding proteins). Блокирование синтеза пептидогликана приводит к лизису клетки и её гибели.

Пенициллин оказывает сильное бактерицидное действие в отношении грамположительных микробов, но не активен в отношении грамотрицательных бактерий. Соль пенициллина натрия применяют в ветеринарии при заболеваниях сибирской язвы, некробактериозе, пневмониях, маститах, эндометритах, раневого и послеродового сепсиса, отите, септицемиях, флегмонах, инфекциях мочеполовых путей, актиномикозе, а

также при бактериальных осложнениях вирусных инфекций, сопровождающихся поражением дыхательной системы [31].

Водорастворимые соли пенициллина — калиевая, натриевая, новокаиновая — используется в виде внутримышечных инъекций. Для приёма внутрь пенициллин не пригоден, т. к. разрушается в желудочно-кишечном тракте. К пенициллину быстро развивается резистентность, поскольку бактерии содержат фермент бета-лактамазу, превращающая его в неактивную форму.

Тетрациклины. Антибиотики тетрациклиновой группы (хлортетрациклин, окситетрациклин и тетрациклин) (см. рис. 2) обладают широким спектром антибактериального действия. Они активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Применяются для лечения инфекционных осложнений при желудочно-кишечных заболеваниях, хирургических вмешательствах, лечения мастита у коров и для профилактики инфекционных заболеваний в качестве кормовой добавки.

Первый представитель тетрациклиновых антибиотиков — хлортетрациклин (ауреомиксин) был открыт в 1948 г. Б. Дуггаром. В 1953 г. группа Р. Б. Вудворда и Ф. А. Хохштейна описали химическую структуру другого представителя тетрациклинов — окситетрациклина (террамицина), получение которого микробиологическим методом было запатентовано ранее фирмой Pfizer. В 1952 г. в СССР был выделен антибиотик биомиксин, оказавшийся идентичным ауреомиксину, который использовался в медицине при лечении инфекционных заболеваний различной этиологии. В настоящее время хлортетрациклин применяется только в животноводстве с лечебно-профилактической целью. Он эффективен для лечения диспепсии, дизентерии, пастереллёза, сальмонеллёза и других желудочно-кишечных заболеваний крупного рогатого скота.

Окситетрациклин (oxytetracycline, террамицин) (рис. 2) получен из культуры *Streptomyces rimosus* в 1950 г. [32]. В 1952 г. восстановительным деацетилированием окситетрациклина синтезирован тетрациклин, а в 1953 г. тетрациклин был выделен как природный продукт из культуральной жидкости *Streptomyces aureofaciens* [33].

Основу химической структуры тетрациклинов составляет изоксантидиловый скелет, к которому присоединены несколько кетонных и гидроксильных групп. Антибиотики различаются между собой по структуре присутствием различных заместителей в кольцах В и С. Механизм действия тетрациклинов заключается в обратимом связывании с рибосомальной субъединицей 30S (4V9A) и в блокировании входа аминоацил-тРНК в А-сайт, что приводит к нарушению синтеза пептидов. Тетрациклины применяют в форме гидро-

хлоридов, поскольку у них лучше, чем в нативной форме, растворимость в воде.

Активность в отношении грамположительных бактерий в ряду хлортетрациклин–тетрациклин–окситетрациклин в большинстве случаев уменьшается. Однако многие штаммы грамотрицательных бактерий (*E.coli*, *Aerobacter*, *Pseudomonas* spp., и др.) несколько более чувствительны к тетрациклину, чем к хлортетрациклину [34]. Из трёх тетрациклинов окситетрациклин является наиболее активным амёбоцидным агентом. В обычно применяемых дозах тетрациклины малотоксичны, действуют бактериостатически.

Тетрациклины выпускаются в форме таблеток (или гранул) и мазей. Гидрохлорид окситетрациклина можно также использовать в виде растворов для внутримышечных инъекций.

Наиболее характерным побочным эффектом всех препаратов тетрациклиновой группы является способность связываться с кальцием в сложные нерастворимые соли, которые накапливаются в костной ткани и эмали зубов. Резистентность к тетрациклинам широко распространена у бактерий.

Стрептомицин. Стрептомицин (см. рис. 2) — исторически второй антибиотик после пенициллина и первый из группы аминогликозидов, выделен З. Ваксманом в 1944 г. [35]. Он образуется актиномицетом *Streptomyces griseus*, активен в отношении большого спектра грамположительных и особенно грамотрицательных бактерий, сыграл важную роль в борьбе с туберкулёзом и чумой.

Стрептомицин относится к группе аминогликозидов, которые ещё называют аминоциклитолами. Молекула стрептомицина состоит из аминоциклитола N,N'-бис(аминоиминометил)-D-стрептамина (2-DOS), к которому присоединён в положении 4 дисахарид. Антибиотик, как правило, содержит примесь близкого по свойствам дигидрострептомицина, который отличается от стрептомицина наличием в дисахариде гидроксиметильной группы вместо альдегидной.

Особенностью строения стрептомицинов является наличие двух гуанидиногрупп, присоединённых к аминоциклитолу в положениях 1 и 3. Стрептомицин останавливает синтез пептидов на рибосоме, связываясь с мишенью 1FJG субъединицы 30S, ингибируя стадии декодирования и транслокации [26]. Стрептомицин и его соли с кислотами хорошо растворимы в воде. Соль сульфата стрептомицина применяют в виде внутримышечных инъекций и внутрь (с целью воздействия на кишечную флору). Антибиотик обладает нефро- и ототоксичностью. В процессе лечения у возбудителя достаточно быстро развивается резистентность.

Гризин. Гризин (гриземин, нурсеотрицин, стрептотрицин) обладает широким спектром дей-

ствия в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, некоторых фитопатогенных грибов и дрожжей. Гризин относится к группе стрептотрицинов. Ранее было показано, что токсичность не позволила использовать стрептотрицины как противомикробные агенты для лечения человека. Он применяется как кормовая добавка в животноводстве под названием кормогризин. Антибиотик эффективен при амёбной дизентерии в применяемых дозах обладает низкой токсичностью [36]. Гризин (см. рис. 2) — смесь природных антибиотиков группы стрептотрицинов с преимущественным содержанием стрептотрицинов D и F. Антибиотики этой группы построены из остатков: аминокислоты β-L-лизина, стрептолидина и одного аминоксахара α-D-гулозамина (карбамоилглюкозамина). Продуцируется культурой *Actinimycetes griseus*.

Стрептотрицин F — первый член семейства стрептотрициновых антибиотиков, был открыт З. А. Ваксманом и Х. Б. Вудроффом в 1942 г. из культуральной жидкости *Streptomyces lavendulae* [37]. Описано также выделение стрептотрицина D из культуры *Streptomyces griseus* [38]. Стрептотрицины блокируют стадию транслокации при элонгации в синтезе пептидов на рибосоме [39].

Изучение ВЭЖХ показало, что во всех пробах гризина, кормогризина и нурсеотрицина доминируют компоненты F и D стрептотрицина, составляющие в сумме 70–90% стрептотрицинового комплекса, причём в нурсеотрицине превалирует стрептотрицин F (56%), а в гризине — стрептотрицин D (51%), в то время как в кормогризине содержание компонентов D и F примерно одинаково [40].

Нурсеотрицин широко использовался в качестве ростового стимулятора в свиноводстве в ГДР с 1981–1988 гг. Менее чем через год после введения нурсеотрицина у свиней, плазмидная резистентность к стрептотрицину по-видимому возникла в штамме *E.coli*, выделенного от свиней, получивших нурсеотрицин [41].

Считается, что поскольку стрептотрицины в медицине не используются, их применение не может способствовать снижению терапевтического действия лекарственных препаратов других классов [42]. В настоящее время в странах Евросоюза гризин не применяется.

Бацитрацин. Бацитрацин (см. рис. 2) продуцируется бактерией *Bacillus licheniformis*. Антибиотик активен в отношении грамположительных микроорганизмов, включая *Clostridium* spp., вызывающих у животных диарею. Особенно чувствительны к бацитрацину кокковые инфекции *S.pyogenes* и *S.aureus*. В медицинской практике применяется как наружное средство при лечении поверхностных кожных инфекций, вызванных этими бактериями. Антибиотик практически не действует на грамотрицательные микроорга-

низмы и не изменяет чувствительность грам-отрицательных кишечных микроорганизмов к другим противомикробным лекарственным средствам. Парентеральное использование бацитрацина в качестве лекарственного препарата в медицинской практике ограничено высокой нефротоксичностью и аллергенностью.

Бацитрацин — природный антибиотик, который относится к группе полипептидов. Он состоит из циклического гомополипептида, к которому через α -аминогруппу остатка лизина присоединён линейный пептид, ацилированный 2-((S)-1-амино-2-метилпропил)-4,5-дигидротиазол-4-карбоксикислотой. Антибиотик выделен из штамма *Bacillus subtilis* в 1943 г. [43]. Бацитрацин останавливает синтез клеточной стенки бактерий, ингибируя мембранно-связанный фермент фосфатазу, ответственный за гидролиз бактопренолпирофосфата (C55) до бактопренолфосфата, необходимого для построения пептидогликана [44]. Бацитрацин активен в виде комплекса с ионом двухвалентного металла, например с Zn^{2+} .

Бацитрацин, как и гризин, применяется в основном как кормовая добавка для увеличения продуктивности стада. Причём в корма сельскохозяйственных животных разрешается добавлять эти антибиотики, вырабатываемые промышленным способом. С этой целью выпускают следующие препараты антибиотиков, стандартизируемые по активному веществу: бацитрацин (бацилихин-10, бацилихин-20 и бацилихин-30), гризин (кормогризин-5, кормогризин-10, кормогризин 40) [45].

Среди применяемых антибиотиков пенициллин обладает наиболее высокой антигенной активностью. Аллергическая реакция на пенициллин свойственна 1–5% людей. В отличие от пенициллина хлорамфеникол, тетрациклин и стрептомицин более токсичны. Наиболее опасное осложнение применения хлорамфеникола — необратимая апластическая анемия. Характерным побочным эффектом всех препаратов тетрациклиновой группы, благодаря наличию в молекуле гидроксильных и кетогрупп, является способность связываться с кальцием в сложные нерастворимые соли, которые накапливаются в костной ткани и эмали зубов. Тетрациклины проникают через плацентарный барьер и обладают тератогенным эффектом, поэтому они особенно опасны для беременных и детей ранее 8-го года жизни. Тетрациклин вызывает изменение состава крови, повреждение паренхимы печени и токсикоз нервной системы. Стрептомицин оказывает токсичное действие на центральную и периферическую нервную систему.

Исследования влияния режимов технологических процессов на стабильность антибиотиков показали, что в большинстве случаев при производстве продуктов питания наблюдается лишь небольшое разрушение антибиотиков, содержа-

щихся в исходном сырье. Так, при производстве молочных продуктов, в зависимости от применяемых режимов тепловой обработки, пенициллин разрушается не более чем на 20%, тетрациклин — на 26%, стрептомицин — на 22% и левомицетин — на 14% [46]. Сбраживание молока незначительно снижает содержание этих антибиотиков (в среднем — до 90,4% от их исходного количества).

Отрицательное действие различных антибиотиков на микробиоту человека или животных проявляется в разной степени в изменении её состава. Изменения метаболизма хозяина, вызванные антибиотиками, ингибируют эффективность лекарств и изменяют иммунные функции [47].

Установлено также, что ряд антибактериальных препаратов, применяемых при терапии сочетанной вирусной (клещевой энцефалит или боллериоз) и бактериальной инфекций (туберкулёз, пневмонии и др.), способны вызывать иммунодепрессию, утяжеление течения острой и активацию персистентной инфекции. Среди антибактериальных препаратов сильными активаторами персистентной инфекции являются тетрациклин и стрептомицин [48].

Подводя итог можно заключить, что антибиотики обладают различным токсическим, аллергическим или иммунным действием, а также влиянием на развитие резистентности патогенных микроорганизмов. Также необходимо учитывать специфичность в чувствительности различных микроорганизмов к действию одного и того же антибиотика при подборе производственно-ценных культур в составе заквасок для молочных продуктов. Следовательно, во избежание отрицательных эффектов побочного действия применение антибиотиков в животноводстве, растениеводстве, в пищевой промышленности должно быть под строгим контролем соответствующих органов.

Контроль содержания антибиотиков в молоке и молочной продукции

В обществе формируется понимание взаимосвязи неоправданно высокого содержания антибиотиков в продуктах питания и состояния здоровья, а также формирования резистентности патогенных микроорганизмов к антибиотикам [49, 50].

В СССР применение антибиотиков в ветеринарии, животноводстве, растениеводстве и в пищевой промышленности развивалось и контролировалось отраслевыми институтами ВАСХНИЛ и Министерства пищевой промышленности СССР [51].

В настоящее время в разных странах, входящих в ВОЗ, ВТО, ЕАЭС, в т. ч. РФ, принимаются нормативные документы и специальные законы, ограничивающие применение антибиотиков в АПК.

В целях обеспечения безопасности производимой продукции, в т.ч. и по содержанию антибиотиков, предприятия разрабатывают и внедряют на практике системы обеспечения безопасности на базе принципов HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points — анализ опасности и критические контрольные точки). Эта концепция базируется на выявлении опасных факторов (в т. ч. и содержание антибиотиков), анализе путей их контаминации, учёта возможности снижения опасного фактора и разработки мер по эффективному контролю и управлению им с последующим документированием. С 2015 г. в России наличие элементов системы HACCP на перерабатывающих предприятиях пищевой отрасли и всех участников цепочки производства сырья и готовой продукции является обязательным требованием. В частности, изучение путей контаминации опасных соединений, в т. ч. антибиотиков, является обязательным элементом разработки элементов системы HACCP [52]. Для оценки и прогнозирования изменения содержания антибиотиков в процессе производства продуктов питания применяется новый научный подход, заключающийся в квалиметрии рисков, включающий в себя прослеживаемость содержания контаминант, матричные диаграммы, корреляционные зависимости и методологию оценки и управления рисками превышения содержания контаминант предельно допустимых значений [53]. Разработаны и утверждены методики определения концентраций антибиотиков в молоке и молочных продуктах.

В РФ содержание левомицетина, пенициллина, тетрациклинов, стрептомицина, гризина и бацитрацина (структуры см. на рис. 2) в молоке и молочных продуктах регламентировано. В табл. 1 приведены допустимые уровни содержания (ДУС) потенциально опасных антибиотиков в молоке и молочной продукции, включая для детей раннего возраста [54].

Данные, приведённые в табл. 1, соответствуют нормативам о ДУС в молоке и молочных продуктах, отраженных в Кодексе Алиментариус [20]. Необходимо отметить, что нежелательное побочное действие на организм человека рассмотренных выше антибиотиков, используемых в медицине, как правило, коррелируют с их содержанием, допустимым в молоке и молочных продуктах. Так, на использование левомицетина, как наиболее токсичном из рассмотренных антибиотиков, наложен запрет в Евросоюзе и на таможенной территории Евразийского экономического союза (ЕЭК, в который входит РФ) [55] значение $ДУС < 0,0003$ мг/кг (ЕЭК, 2018) [56]. В более ранних документах концентрация левомицетина в молоке и молочных продуктах не допускалась при более высоких концентрациях: $ДУС < 0,01$ [55]. Пенициллин, хотя и относится к наименее токсич-

ным антибиотикам, имеет ограничения: $ДУС < 0,004$ мг/кг, однако эти ограничения и не такие строгие, как для левомицетина.

Для тетрациклиновой группы установлено ещё более высокое значение $ДУС < 0,01$ мг/кг, хотя оно ещё довольно значительное (см. также ссылку [50]). На долю молока на предмет содержания тетрациклинов среди изученных видов пищевых продуктов животного происхождения приходится 35% всех публикаций [57]. Ещё на порядок выше значения имеет $ДУС < 0,2$ и $< 0,5$ мг/кг для стрептомицина и гризина, соответственно. Для бацитрацина наибольшее ограничение введено для продуктов детского питания ($ДУС < 0,02$ мг/кг).

Нормативные документы, разрешённые к использованию в РФ, основаны на различных методах определения допустимых остаточных концентраций антибиотиков в молоке и молочных продуктах. Методы эти делятся на микробиологические, биохимические и физико-химические, которые в свою очередь имеют свои особенности, преимущества и недостатки.

Методы определения допустимых уровней содержания антибиотиков в молоке и молочных продуктах

Микробиологические методы. Согласно документу [58], в микробиологическом методе для определения левомицетина, тетрациклинов, пенициллина, стрептомицина и гризина используются стандартизированные тест-культуры вегетативных форм спорообразующих и неспорообразующих культур: *Bacillus subtilis*, вар. 6633; *B. subtilis*, вар. L2; *B. mycoides* 537; *Micrococcus luteus* ATCC 9341, обладающих высокой чувствительностью к антибиотикам. Культура *B. subtilis*, вар. 6633 пригодна для определения большинства антибиотиков, а для бацитрацина прежде всего рекомендована культура *M. luteus* ATCC 9341.

Сущность микробиологического метода заключается в сравнении зон задержки роста тест-культуры испытуемым препаратом и стандартом антибиотика. С помощью, например штамма *B. subtilis* L2, по диаметру зоны задержки роста вокруг бумажного диска, пропитанного экстрактом молока, также можно определить в субстрате наличие пенициллина, тетрациклина, стрептомицина и гризина [59]. Широко распространён также тест-микроб *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953, который применяется в тест-системе под названием Дельвотест-R (Нидерланды). Нижний предел чувствительности тест-системы Дельвотест-R к антибиотикам составляет в мг/кг: для левомицетина — 0,5, пенициллина — 0,002, тетрациклина — 0,01 и стрептомицина 0,04. Для

определения гризина рекомендована тест-культура *B.subtilis* 6633, чувствительность метода — 0,5 мг/л. Модифицированный автором микробиологический метод в сочетании с методом ВЭЖХ (см. ниже) позволяют определять содержание антибиотиков в диапазоне 0,01–100 мг/кг [60].

Биохимические методы. Наиболее распространённым методом является иммунологический метод, основанный на специфическом взаимодействии антигенов и антител [61]. Наиболее распространённым вариантом этого метода является иммуноферментный анализ (ИФА), который может использоваться для выявления проб с более низким содержанием антибиотиков, чем микробиологический.

При специфическом взаимодействии антигена и антигена (антибиотика) происходит изменение окраски испытуемого материала, что обозначает положительный или отрицательный результат. Окрашивание можно определить на специальной полоске визуально или с помощью измерительного прибора. Визуальная детекция используется в экспресс-методе, который может обнаруживать только одну или несколько групп антибиотиков. Имеются тесты на все четыре группы антибиотиков: левомицетина, пенициллина, тетрациклина и стрептомицина. Для более точного определения содержания антибиотиков в молоке применяют инструментальный анализ с помощью специальных наборов, измеряющих интенсивность окрашивания.

Разновидностью иммунологического метода является иммунофлуоресцентный метод, который основан на использовании в иммунологической реакции антител, меченных флуоресцентной меткой. Метод применяется для определения наличия остаточного содержания антибиотиков в молоке с применением иммунохимического биоанализатора. Содержание антибиотиков в исследуемом материале предусмотрено ГОСТ Р 59507-2021 (в мкг/кг): для левомицетина — 0,15–0,25, пенициллина — 2, окситетрациклина — 5–8, тетрациклина — 7–10, хлортетрациклина — 2–5 и стрептомицина — 50–100. Методы, перечисленные в этом национальном стандарте, не являются контрольными. В качестве контрольного метода применяют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектором.

Физико-химические методы. Методы ВЭЖХ и ВЭЖХ в сочетании с методами масс-спектрометрии относятся к физико-химическим методам. В первом варианте метод основан на экстракции антибиотиков из пробы продукта, очистке экстракта и определении антибиотиков в экстракте методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием [62]. В качестве сравнения используются образцы соответствующих антибио-

тиков. Диапазон измерений массовых долей антибиотиков для левомицетина (хлорамфеникола) составляет от 0,0001 до 1,0 мг/кг, для антибиотиков пенициллиновой и тетрациклиновой групп от 0,001 до 1,0 мг/кг, для стрептомицина от 0,005 до 1,0 мг/кг. Аналогично Международная Ассоциация Официальных Химиков-аналитиков (АОАС) рекомендует использовать ВЭЖХ с УФ-детектированием в качестве официального метода анализа остатков тетрациклина в пищевых продуктах животного происхождения, таких как коровье молоко [63].

В некоторых работах используется метод жидкостной хроматографии в сочетании с методом фракционной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) как метод, утверждённый для образцов молока и аккредитованный INMETRO (Laboratorio Nacional Agropescaário, 2012) [64]. Во втором варианте прибор ВЭЖХ может быть снабжен прибором масс-спектрометрии с высоким разрешением с использованием технологии Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Так, например, использование этого метода позволило обнаружить пенициллин прокаин в концентрации незначительно выше его ДУС (4 нг/мл) [65]. Помимо обычного метода ВЭЖХ в исключительных случаях используется метод Ультра-ВЭЖХ (УВЭЖХ), который за счёт улучшенной чувствительности и разрешения с помощью материала носителя колонки с меньшим размером частиц (<2 мкм) преодолевает ограничения обычного ВЭЖХ. Этот метод предложен для изучения остаточных количеств антибиотиков в молоке как наиболее точный из всех рассмотренных выше.

Большинство рекомендаций связано с необходимостью проведения обработки образца перед стадией очистки. Немногие методы способны обнаруживать остатки тетрациклина в продуктах животного происхождения пищевых продуктов без соответствующей обработки образцов. Это можно объяснить характером сложности пищевых систем. Хотя прямой анализ в реальном времени проведения масс-спектрометрии (Direct analysis in real time mass spectrometry, DART-MS) признан лучшей техникой среди известных, нельзя игнорировать тот факт, что отсутствие этапа разделения перед ионизацией во время применения метода может привести к очень выраженному подавлению сигнала и, следовательно, более низкой избирательности обнаружения. В этом смысле эффективность применения ограничена разрешением массовых чисел. Это является ключевым фактором, которое следует учитывать при выборе выполнения анализов с использованием DART-MS [57].

Метод жидкостной хроматографии (ЖХ) в сочетании с масс-спектрометрией. Методом ЖХ/МС/МС можно изучать изменение концентрации

остатков тетрациклинов (окситетрациклина, тетрациклина и хлортетрациклина) в процессе превращения загрязнённого антибиотиками молока в молочные продукты и влияние этапа снятия сливок и стадии пастеризации [66]. Метод tandemной масс-спектрометрии (МС/МС) предполагает фрагментацию молекулы вещества с использованием тройного квадруполя (в ячейке столкновений под действием ионных частиц). Молекулы тетрациклинов были неравномерно распределены между фракциями производных молока. Самые высокие концентрации были определены в твороге и сыре в диапазонах 0,320–0,48 мг/кг и 0,28–0,56 мг/кг, соответственно. Низкие уровни антибиотиков наблюдались в масле и сыворотке (0,012–0,041 мг/кг). Тетрациклины были обнаружены в простокваше (0,66–0,11 мг/кг), сливках (0,085–0,115 мкг/кг) и пахте (196–221 мкг/кг) на гораздо более высоких уровнях, чем в сливочном масле и сыворотке, но ниже, чем в твороге, молоке и сыре. Единственным недостатком этих тестов является длительное время тестирования.

Таким образом, в зависимости от поставленных задач и возможностей исследователей могут быть применены вышеперечисленные методы определения остаточных количеств антибиотиков в молоке и молочных продуктах.

Заключение

Проведённые исследования показывают множественную лекарственную устойчивость выделенных от животных микроорганизмов, которая является результатом излишне широкого применения антимикробных препаратов для лечения и профилактики бактериальных болезней животных. Применение антибиотиков как кормовых добавок для стимуляции роста и продуктивности животных также приводит к росту резистентности микроорганизмов, вызывающих болезни животных и людей. Наибольшую озабоченность вызывают риски контаминации антибиотиков в молоке и молочных продуктах, качество которых влияет на здоровье подрастающего поколения, т.е. на наше будущее. И тут возникает закономерный вопрос, как сохранить темпы производства без добавок антибиотиков, и какие рекомендации следует дать ветеринарам, если применение антибиотиков неизбежно?

В трёх регионах страны — Ленинградская и Белгородская области, Краснодарский край — запускается пилотная программа системы контроля антимикробных препаратов (СКАМП). В рамках программы используется оборудование, обеспечивающее для производителей бесплатную проверку проб мяса, яиц, молока более чем на 90 антибиотиков. Маркировка «Без антибиотиков» означает, что технология, организованная

на предприятиях обеспечивает выпуск качественной и безопасной продукции. Подразумевается также, что антибиотики не применяются для стимуляции роста и применяются только для лечения продуктивности животных.

Научные исследования показали, что используемые на практике технологические режимы производственных процессов не способны существенно снизить исходное содержание антибиотиков в сырье. Поэтому единственным способом обеспечения безопасности продуктов питания по содержанию в них остаточного количества антибиотиков является жёсткий входной приёмочный контроль закупаемого сырья, в т. ч. и путём разработки и применения высокочувствительных методик определения содержания антибиотиков.

Основными правилами по предотвращению попадания остатков антибиотиков в сельскохозяйственное сырье и продукты питания в количествах, превышающие предельно допустимые нормы, являются:

- запрет на использование в качестве пищевого сырья животного происхождения, полученного от животных, подвергшихся воздействию натуральных и синтетических антибиотиков и других лекарственных средств для ветеринарного применения, введённых перед убоем до истечения сроков их выведения из организмов таких животных;

- запрет на использование в качестве пищевого сырья молока, полученного от животных, подвергшихся воздействию антибиотиков и других лекарственных средств для ветеринарного применения, до истечения сроков их выведения из организмов таких животных;

- мониторинг и контроль ветеринарного состояния на ферме;

- контроль сопроводительной документации на каждую партию сельскохозяйственного сырья животного происхождения, в т. ч. ветеринарного свидетельства;

- прослеживаемость сельскохозяйственного сырья и продуктов питания с использованием государственной информационной системы «Меркурий ХС»;

- приёмочный входной контроль сырья на перерабатывающем предприятии;

- периодический приёмочный контроль готовой продукции на содержание антибиотиков.

Раз в полгода необходимо проверять производство молочной продукции на содержание остаточных количеств указанных антибиотиков (левомецитин, пенициллин, тетрациклин и стрептомицин).

В мировой практике рекомендована классификация антибиотиков федерального правительства США (FDA), в которой они разделены на три группы в зависимости от возможности исполь-

Таблица 2. Основные группы антибиотиков, используемых для лечения человека и животных
Table 2. Major groups of antibiotics used to treat humans and animals

Класс	Ветеринарные*	Медицинские
Пенициллины** (бета-лактамы)	Амоксициллин	Пенициллин G (прокаин)
Макролиды***	Тилозин*, Азитромицин	Эритромицин, Азитромицин
Аминогликозиды***	Апрамицин*, Неомицин, Гентамицин	Гентамицин
Фторхинолоны***	Энрофлоксацин*, Ципрофлоксацин, Левофлоксацин, Офлоксацин	Ципрофлоксацин, Левофлоксацин, Офлоксацин
Тетрациклины**	Хлортетрациклин*, Окситетрациклин	Доксициклин
Фениколы	Флорфеникол*, Тиамфеникол	Хлорамфеникол
Цефалоспорины*** (бета-лактамы)	Цефалексин	Цефтазидим, Цефексим
Полипептиды	Энрамицин*	Бацитрацин
Стрептограмины**	Вирджиниамицин*	Синергид (Квинпристин-далфопристин)
Плевромутилины***	Тиамулин*	Ретапамулин

Примечание. * — препараты, применяемые только в ветеринарии; ** — важный класс антибиотиков для развития резистентности; *** — критически важный класс антибиотиков для развития резистентности.

Note. * — drugs used only in veterinary medicine; ** — an important class of antibiotics for resistance development; *** — a critically important class of antibiotics for resistance development.

зования для лечения людей (медицинские) и животных (ветеринарные) (табл. 2) [67]:

1. Медицинские антибиотики для использования только у людей, они не рекомендованы для лечения животных.

2. Медицинские и ветеринарные антибиотики для использования у людей и животных, эта группа должна использоваться у животных только по терапевтическим показаниям и под присмотром ветеринара.

3. Ветеринарные антибиотики разработаны и разрешены для использования только у животных, поскольку животные восприимчивы к заболеваниям, которые не распространяются на людей и, кроме того, у них другие требования к здоровью, нежели у людей.

В лечении животных предлагаются антибиотики, которые с точки зрения развития резистентности микроорганизмов имеют наименьшую безопасность. В выборе антибиотиков, рекомендуемых для лечения животных, необходимо руководствоваться основными правилами: использовать антибиотики, рекомендуемые только как ветеринарные, желательно не имеющие аналогов среди препаратов, используемых в медицинских целях. Антибиотики разных классов по-разному влияют на развитие микроорганизмов. Рекомендовано не использовать те антибиотики, которые относятся к одному классу по химическому строению. Дело в том, что, как правило, из-за общего для всей группы механизма действия устойчивость бактерий к одному антибиотику, часто распространяется ко всему классу этих антибиотиков.

Исключительно к ветеринарным лекарственным препаратам относят антибиотики разных классов: тилозин (макролиды), апрамицин (аминогликозиды), энрофлоксацин (фторхинолоны), хлортетрациклин (тетрациклины), вирджиниамицин (стрептограмины), флорфеникол (амфе-

никилы), энрамицин (полипептиды) и тиамулин (плевромутилины).

Но поскольку в ветеринарии применяются антибиотики тех же классов, что и в медицине, не рекомендованы к применению любые пенициллины, тетрациклины и стрептограмины, поскольку они важны с точки зрения опасности развития резистентности. И особенно не рекомендованы для использования антибиотики классов: макролидов, аминогликозидов, фторхинолонов, цефалоспоринов и плевромутилинов, которые критически важны из-за развития резистентности.

Председатель Правительства Д. А. Медведев 4 октября 2017 г. утвердил внесённую Минздравом России Стратегию предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 г. (утв. распоряжением Правительства РФ 25.09.2017 г. N 2045-р, далее — Стратегия) [68].

Определены три основных направления Стратегии: 1) снижение количества применяемых антибиотиков в животноводстве; 2) обучение врачей правильному их назначению; 3) ужесточение контроля над отпуском таких лекарств. Принятая Стратегия должна помочь решению проблемы антибиотикорезистентности в РФ.

Основные рекомендации сводятся к следующему.

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует фермерам и пищевой промышленности прекратить регулярное использование антибиотиков в целях стимулирования роста и профилактики болезней среди здоровых животных, использовать их только для лечения животных в случае крайне необходимости.

2. Антибиотики, используемые для животных, необходимо выбирать среди тех, которые, согласно классификации ВОЗ, являются «наименее важными» для здоровья людей и не входят в число

«высокоприоритетных критически важных» антибиотиков. Такие антибиотики часто являются препаратами последней линии или входят в число ограниченных препаратов, доступных для лечения тяжёлых бактериальных инфекций у людей.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов при подготовке данной статьи; данное исследование проведено при поддержке Минобрнауки России в рамках согла-

шения № 075-15-2020-905 от 16 ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Участие авторов. Олсуфьева Е. Н. — анализ и интерпретация литературы, редактирование, финальное утверждение рукописи. Янковская В. С. — анализ и интерпретация литературы, написание текста; Дунченко Н. И. редактирование, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

1. Экономика, 19:00, 14 марта 2016. <https://www.interfax.ru/business/498421>. [Ekonomika, 19:00, 14 marta 2016. <https://www.interfax.ru/business/498421> (in Russian)]
2. Шенеткина С.В. Современные принципы антибиотикотерапии в ветеринарии в Материалах V-го Международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии» СПб.: 2019; 230–232. [Shchetkina S.V. Sovremennye printsipy antibiotikoterapii v veterinarii v Materialakh V-go Mezhdunarodnogo kongressa veterinarnykh farmakologov i toksikologov «Effektivnye i bezopasnye lekarstvennye sredstva v veterinarii» SPb.: 2019; 230–232. (in Russian)]
3. Симджи III, Дул Р, Козлов Р.С. Антимикробные препараты. Рациональное применение антибиотиков в животноводстве и ветеринарии. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2016; 18 (3): 186–190. [Simdzhii Sh., Dul R., Kozlov R.S. Antimikrobynye preparaty. Ratsional'noe primeneniye antibiotikov v zhivotnovodstve i veterinarii. Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya. 2016; 18 (3): 186–190. (in Russian)]
4. Gottlieb D. The production and role of antibiotics in soil. J. Antibiot. 1976; 29 (10): 987–1000. doi:10.7164/antibiotics.29.987.
5. Алексеев Н.Р., Шелепов И.А. Антибиотики и корма. Современный фермер. 2013; 4: 48–51. [Aleksseev N.R., Shelepov I.A. Antibiotiki i Korma. Sovremennyy Fermer. 2013; 4: 48–51. (in Russian)]
6. В.Чупин. Московский Комсомолец. 26 ноября 2021. https://www.mk.ru/economics/2021/11/26/rossiyskie-syry-okazalis-nabity-antibiotikami.html?utm_source=yxnews&utm_medium=desktop [V.Chupin. Moskovskiy Komsomolets. 26 noyabrya 2021. https://www.mk.ru/economics/2021/11/26/rossiyskie-syry-okazalis-nabity-antibiotikami.html?utm_source=yxnews&utm_medium=desktop (in Russian)]
7. Гамаюнов В.М., Кольцов Д.Н. Экологическая безопасность производства молока и профилактика мастита у коров на молочном комплексе. Материалы V-го Международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства в ветеринарии». СПб.: 2019; 42–45. [https://spbguv.ru/wp-content/uploads/2019/05](https://spbguv.ru/wp-content/uploads/2019/05/Gamayunov_V.M.,Kol'tsov_D.N.Ekologicheskaya_bezopasnost'_proizvodstva_moloka_i_profilaktika_mastita_u_korov_na_molochnom_komplekse.Materialy_V-go_Mezhdunarodnogo_kongressa_veterinarnykh_farmakologov_i_toksikologov_«Effektivnye_i_bezopasnye_lekarstvennye_sredstva_v_veterinarii»_SPb.:_2019;_42–45._https://spbguv.ru/wp-content/uploads/2019/05) [Gamayunov V.M., Kol'tsov D.N. Ekologicheskaya bezopasnost' proizvodstva moloka i profilaktika mastita u korov na molochnom komplekse. Materialy V-go Mezhdunarodnogo kongressa veterinarnykh farmakologov i toksikologov «Effektivnye i bezopasnye lekarstvennye sredstva v veterinarii». SPb.: 2019; 42–45. <https://spbguv.ru/wp-content/uploads/2019/05> (in Russian)]
8. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis., 2009; 48 (1): 1–12. doi: 10.1086/595011.
9. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discover, and development of new antibiotics. World Health Organization, 2017.
10. Lo'pez D., Vlamakis H., Kolter R. Biofilms. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010; 2: 11. doi: 10.1101/cshperspect.a000398.
11. Parrino B., Schillaci D., Carnevale I., Giovannetti E., Diana P., Cirrincione G. et al. Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance. Eur J Med Chem. 2019; 1 (161): 154–178. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.036
12. Маневич Б.В., Кузина Ж.И., Харитонов Е.Б., Орлова Т.В. Борьба с биоплёнками на молочных предприятиях. Молочная промышленность. 2018; 12: 12–14. [Manevich B.V., Kuzina Zh.I., Kharitonova E.B., Orlova T.V. Bor'ba s bioplenkami na molochnykh predpriyatiyakh. Molochnaya Promyshlennost'. 2018; 12: 12–14. (in Russian)]
13. Шенеткина С.В. Организация системы контроля антимикробных препаратов в условиях сельскохозяйственного производства. Актуальные вопросы сельскохозяйственной биологии. 2017; 4 (6): 15–20. [Shchetkina S.V. Organizatsiya sistemy kontrolya antimikrobnnykh preparatov v usloviyakh sel'skokhozyajstvennogo proizvodstva. Aktual'nye Voprosy Sel'skokhozyajstvennoy Biologii. 2017; 4 (6): 15–20. (in Russian)]
14. Practical Antimicrobial Therapeutics. 6. Pages 153–174 in Veterinary Medicine. Book. 11th Edition. Edited by: Kenneth PDC, Stanley WH,

- Grünberg HDW. Elsevier Ltd. 2017. DOI.org/10.1016/B978-0-7020-5246-0.00006-1
15. Янковская В.С. Конференция «Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством»: сборник научных трудов. Ред. А.Г. Галстян. М.: Издательство и типография «Сад-издат», 2020; 645–651. [Yankovskaya V.S. Konferentsiya «Aktual'nye voprosy molochnoy promyshlennosti, mezhotraslevye tekhnologii i sistemy upravleniya kachestvom»: sbornik nauchnykh trudov. Red. A.G. Galstyan. M.: Izdatel'stvo i tipografiya «Sad-izdat», 2020; 645–651. (in Russian)]
16. Dunchenko N.I., Yankovskaya V.S., Voloshina E.S., Ginzburg M.A., Kupriy A.S. Designing the quality and ensuring food safety based on qualimetric forecasting. Food Science and Technology, 2022 (в печати).
17. Мунеева Л.П., Шелепова С.А. Антибиотики в сельском хозяйстве как фактор формирования антимикробной резистентности и источник контаминации пищевой продукции. Успехи медицинской микологии. 2019; XX: 6. Антимикотики и фунгициды: 441–446. [Muneeva L.P., Shelevova S.A. Antibiotiki v sel'skom khozyajstve kak faktor formirovaniya antimikrobnoy rezistentnosti i istochnik kontaminatsii pishchevoy produktsii. Uspekhi Meditsinskoj Mikologii. 2019; XX: 6. Antimikotiki i fungitsidy: 441–446. (in Russian)]
18. Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. Molecules. 2018; 23 (795). doi: 10.3390/molecules23040795.
19. Минздрав Республики Беларусь. Постановление от 18.01.2010 №9. О внесении дополнений и изменений в постановление от 9 июня 2009 г. № 63 <https://www.fao.org/faolex/results/details/ru/c/LEX-FAOC113033/> [Minzdrav Respubliki Belarus'. Postanovlenie ot 18.01.2010 №9. O vnesenii dopolnenij i izmenenij v postanovlenie ot 9 iyunya 2009 g. № 63 <https://www.fao.org/faolex/results/details/ru/c/LEX-FAOC113033/>]
20. Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) 13.02.2018 № 28 и Кодекс Алиментарис (Codex Alimentarius for residues of veterinary drugs in food CX/MRL 2-2018). <https://www.anses.fr/fr/system/files/report-ccrvdf.pdf>. [Resheniya Kollegii Evrazijskoj ekonomicheskoy komissii (EEK) 13.02.2018 № 28 i Kodeks Alimentaris (Codex Alimentarius for residues of veterinary drugs in food CX/MRL 2-2018). <https://www.anses.fr/fr/system/files/report-ccrvdf.pdf>. (in Russian)]
21. Hutchings I.M., 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.
22. Щекотихин А.Е., Олсуфьева Е.Н., Янковская В.С. Антибиотики и родственные соединения. Научное издание. М.: Лаборатория знаний, 2022; 511. [Shchekotikhin A.E., Olsufeva E.N., Yankovskaya V.S. Antibiotiki i rodstvennye soedineniya. Nauchnoe izdanie. Moscow: Laboratoriya Znaniy, 2022; 511. (in Russian)]
23. Ehrlich J., Bartz Q.R., Smith R.M., Joslyn D.A., Burkholder P.R. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil Actinomycete. Science, 1947; 106 (2757): 417. doi: 10.1126/science.106.2757.417. (in Russian)]
24. Справочник химика. Изв. вузов. Химия и химическая технология. 2003; 46 (5). Иваново, 353. http://ctj.isuct.ru/files/2003/v46_n05_2003_full.pdf [Spravochnik khimika. Izv. vuzov. Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya. 2003; 46 (5). Ivanovo, 353. http://ctj.isuct.ru/files/2003/v46_n05_2003_full.pdf (in Russian)]
25. Справочник лекарственных средств «Видаль-Ветеринар» <https://www.vidal.ru/veterinar> [Spravochnik lekarstvennykh sredstv «Vidal'-Veterinar» <https://www.vidal.ru/veterinar>]
26. Walsh C., Wencewicz T.A. Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities. Washington, DC: ASM Press, 2016; 43.
27. Rossolini G.M., Arena E., Giani T. Sec. 7. Anti-infective Therapy. Chapter 138 Mechanisms of Antibacterial Resistance. 1181–1196. e1. January 2017. In book: Infectious Diseases. doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00138-6.
28. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. infl uenzae. Br J Exp Pathol. 1929; 10 (3): 226–236. PMID: PMC2048009.
29. Chain E., Florey H.W., Adelaide M.B., Gardner A.D., Heatley N.G., Jennings M.A. et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent. The Lancet. 1940; 236 (6104): 226–228.

30. Ford B.J. Crisis point: the rise and fall of penicillin. *The Microscope J.* 2014; 62 (3); 123–135.
31. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. 2000–2007. НИИAX СГМА, с. 57. <https://microbius.ru/library/pod-red-l-s-strachunskogo-yu-b-belousova-s-n-kozlova-prakticheskoe-rukovodstvo-po-antiinfekcionnoy-himioterapii> [Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfekcionnoy himioterapii (in Russian)]
32. Finlay C., Hobby G.L., Pan S.Y., Regna P.P., Routien J.B., Seeley D.B. et al. Terramycin, a new antibiotic. *Science.* 1950; 111 (2874): 85. doi:10.1126/science.111.2874.85.
33. Boothe J.H., Morton J. II, Petisi J.P., Wilkinson R.G., Williams J.H. Tetracycline. *J Am Chem Soc.* 1953; 75 (18): 4621. doi: 10.1021/ja01114a535.
34. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65 (2): 232–260. doi:10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.
35. The history of antibiotics: Parascandola J. (ed). A Symposium. Madison, Wisconsin: American Institute of the History of Pharmacy, 1980; 136.
36. Применение антибиотиков в ветеринарии и животноводстве. https://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_biology/1790/Primenenie. [Primenenie antibiotikov v veterinarii i zhivotnovodstve. https://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_biology/1790/Primenenie. (in Russian)]
37. Jonák J., Rychlík I., Streptotricin F Modes and mechanism of microbial growth inhibitors. antibiotics. Ed. Hahn F.E., Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, NY, Tokyo, VI, 1983; 238–247.
38. Патент на изобретение RU 2144292 C1, 2000. Способ получения препарата для борьбы с болезнями растений. [Patent na izobretenie RU 2144292 C1, 2000. Sposob polucheniya preparata dlya bor'by s boleznyami rastenij. (in Russian)]
39. Haupt I., Huberner R., Thrum H. Streptothricin F, An Inhibitor of protein synthesis with miscoding activity. *J Antibiot.* 1978; 31 (11): 1137–1142. doi: 10.7164/antibiotics.31.1137.
40. Викторов А.В., Плеваков Е.Н., Дриняев В.А. Новый метод ВЭЖХ для определения основных компонентов стрептотрицинового комплекса. Анализ нурсеотрицина, гризина и кормогризина. Антибиотики и химиотер. 2006; 51 (2): 8–12. [Viktorov A.V., Pleshakov E.N., Drinyayev V.A. Novy metod VEZhKh dlya opredeleniya osnovnykh komponentov streptotritsinovogo kompleksa. Analiz nurseotritsina, grizina i kormogrizina. *Antibiotiki i khimioter.* 2006; 51 (2): 8–12. (in Russian)]
41. Webb H.E. Illustrative example of probable transfer of resistance determinants from food-producing animals to humans: streptothricins, glycopeptides, and colistin. Annex 5. Summaries of the narrative literature reviews. WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. WHO 2017; 59–60. ISBN 978-92-4-155013-0.
42. Кирюткин Г.В., Тимофеев Б.А., Созинов В.А. Справочник ветеринарных препаратов, химиотерапевтические препараты, Киров, 1997; 598. ISBN 5-88186-149-3. <http://antibiotest.ru/2017/01/17/grizin-kormovoj-antibiotik/> [Kirjyutkin G.V., Timofeev B.A., Sozinov V.A. Spravochnik veterinarnykh preparatov, khimioterapevticheskie preparaty, Kirov, 1997; 598. ISBN 5-88186-149-3. <http://antibiotest.ru/2017/01/17/grizin-kormovoj-antibiotik/> (in Russian)]
43. Sarkar P., Yarlagaadda V., Ghosh C., Haldar J. A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. *Med Chem Comm.* 2017; 8 (3): 516–533. doi: 10.1039/c6md00585c.
44. Walsh C.T., Wencewicz T.A. Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities. Washington, DC: ASM Press, 2016; 49.
45. Отечественные ветеринарные препараты. <http://www.cnsnb.ru/AKDIL/0031/base/RB/000088.shtm>. [Otechestvennyye veterinarnyye preparaty. <http://www.cnsnb.ru/AKDIL/0031/base/RB/000088.shtm>. (in Russian)]
46. Kosikowski E.V., Jimenez-Flores R. Removal of penicillin G from contaminated milk by ultrafiltration. *J. Dairy Sci.* 1986; 68 (12): 3224–3233.
47. Yang J.H., Bhargava P., McCloskey D., Mao N., Palsson B.O., Collins J.J. Antibiotic-induced changes to the host metabolic environment inhibit drug efficacy and alter immune function. *Cell Host & Microbe.* 2017; 22: 757–765. doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.020.
48. Колясников Н.М., Маленко Г.В., Щербинина М.С., Ишмухаметов А.А., Погодина В.В. Выбор антибиотиков для терапии бактериальных инфекций при остром течении клещевого энцефалита. Молекулярная диагностика и биобезопасность — 2020. с. 34–39. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием (6–8 октября 2020 года). Сб. материалов. Ред. В.Г. Акимкин, М. Г. Творогова. Москва ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора 2020; 256. ISBN 978-5-9900432-9-9. <https://www.crie.ru/images/science/materials-mdb2020.pdf> [Kolyasnikov N.M., Malenko G.V., Shcherbinina M.S., Ishmukhametov A.A., Pogodina V.V. Vybore antibiotikov dlya terapii bakterial'nykh infektsij pri ostrom techenii kleshchevogo entsefalita. Molekulyarnaya diagnostika i biobezopasnost' — 2020. s. 34–39. Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya s mezhdunarodnym uchastiem (6–8 oktyabrya 2020 goda). Sb. materialov. Red. V.G. Akimkin, M.G. Tvorogova. Moskva FBUN TsNII Epidemiologii Rosпотребнадзора 2020; 256. ISBN 978-5-9900432-9-9. <https://www.crie.ru/images/science/materials-mdb2020.pdf> (in Russian)]
49. Минаева Л.П., Шевелева С.А. Антибиотики в сельском хозяйстве как фактор формирования антимикробной резистентности и источник контаминации пищевой продукции. Успехи медицинской микологии. 2019; 20: 441–444. [Minaeva L.P., Sheveleva S.A. Antibiotiki v sel'skom khozyajstve kak faktor formirovaniya antimikrobnoy rezistentnosti i istochnik kontaminatsii pishchevoj produktsii. *Uspekhi Meditsinskoj Mikologii.* 2019; 20: 441–444. (in Russian)]
50. Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules.* 2018; 23: 795. doi:10.3390/molecules23040795.
51. Левина Е.С. Организация исследований и производства отечественных антибиотиков в 1940–1950-х гг. Проблемы и их решение. Институт истории естествознания и техники им. С. И. Вавилова. Годичная научная конференция, 2003. М.: Диполь-Т, 2003; 54–62. [Levina E.S. Organizatsiya issledovaniy i proizvodstva otechestvennykh antibiotikov v 1940-1950-kh gg. Problemy i ikh reshenie. Institut istorii estestvoznaniya i tekhniki im. S.I. Vavilova. Godichnaya nauchnaya konferentsiya, 2003. M.: Dipol'-T, 2003; 54–62. (in Russian)]
52. Yankovskaya V.S., Dunchenko N.I., Voloshina E.S., Laftisheva I.A., Ginzburg M.A. Improving agricultural products risk management approaches based on risk quality and the HACCP Principles. III International Scientific and Practical Conference «Advanced technologies and system research in the cooperative sector of the economy», 2022 (в печати).
53. Янковская В.С., Дунченко Н.И., Волошина Е.С., Кулцова С.В., Маницкая Л.Н. Методология квалитетрии рисков как основа для обеспечения качества и безопасности продукции. Молочная промышленность. 2021; 11: 52–53. [Yankovskaya V.S., Dunchenko N.I., Voloshina E.S., Kuptsova S.V., Manitskaya L.N. Metodologiya kvalitetrii riskov kak osnova dlya obespecheniya kachestva i bezopasnosti produktsii. *Molochnaya Promyshlennost'*. 2021; 11: 52–53. (in Russian)]
54. Приложение N 4 к Техническому Регламенту Таможенного Союза ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» <https://docs.cntd.ru/document/499050562> и требования ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» <http://www.tsouz.ru/db/techreglam/Documents/TR%20TS%20PishevayaProd.pdf>. [Prilozhenie N 4 k Tekhnicheskomu Reglamentu Tamozhennogo Soyuza TR TS 033/2013 «O bezopasnosti moloka i molochnoy produktsii» <https://docs.cntd.ru/document/499050562> i trebovaniya TR TS 021/2011 «O bezopasnosti pishchevoj produktsii» <http://www.tsouz.ru/db/techreglam/Documents/TR%20TS%20PishevayaProd.pdf>. (in Russian)]
55. Перечень ветеринарных лекарственных средств, запрещённых для использования продуктивным животным на таможенной территории Евразийского экономического союза (Приложение № 2) к Распоряжению Коллегии Евразийской экономической комиссии от 19 октября 2021 г. N 170. «О Правилах регулирования обращения ветеринарных лекарственных средств на таможенной территории Евразийского экономического союза» <https://www.alt.ru/tamdoc/21r00170/> [Perechen' veterinarnykh lekarstvennykh sredstv, zapreshchennykh dlya ispol'zovaniya produktivnym zhivotnym na tamozhennoy territorii Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza (Prilozhenie № 2) k Rasporyazheniyu Kollegii Evraziyskoj ekonomicheskoy komissii ot 19 oktyabrya 2021 g. N 170. «O Pravilakh regulirovaniya obrashcheniya veterinarnykh lekarstvennykh sredstv na tamozhennoy territorii Evraziyskogo ekonomicheskogo soyuza» <https://www.alt.ru/tamdoc/21r00170/> (in Russian)]
56. Из Регламента Европейского Союза от 22 декабря 2009 г. № 37/2010 по фармакологически активным веществам и их классификации относительно максимальных пределов остатков в пищевых продуктах животного происхождения утверждён список запрещённых веществ ветеринарного применения для продуктивных животных. <http://rshn-tver.ru/news/news-9666/>. (Приложение N 4 к техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013) <https://docs.cntd.ru/document/499050562> [Iz Reglamenta Evropejskogo Soyuza ot 22 dekabrya 2009 g. № 37/2010 po farmakologicheski aktivnym veshchestvam i ikh klassifikatsii otnositel'no maksimal'nykh predelov ostatkov v pishchevykh produktakh zhivotnogo proiskhozhdeniya utverzhden spisok zapreshchennykh veshchestv veterinarnogo primeneniya dlya produktivnykh zhivotnykh. <http://rshn-tver.ru/news/news-9666/>. (Prilozhenie N 4 k tekhnicheskomu reglamentu Tamozhennogo soyuza «O bezopasnosti moloka i molochnoy produktsii» (TR TS 033/2013) <https://docs.cntd.ru/document/499050562> (in Russian)]
57. Pérez-Rodríguez M., Pellerano R.G., Pezza L., Pezza H.R. An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination. *Talanta.* 2018; 182: 1–21. doi: 10.1016/j.talanta.2018.01.058.
58. ГОСТ 31903-2012 <https://docs.cntd.ru/document/1200101976> [ГОСТ 31903-2012 <https://docs.cntd.ru/document/1200101976> (in Russian)]
59. Кальницкая О.И. Ветеринарно-санитарный контроль остаточных количеств антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения. Докторская диссертация. М.: 2008. <http://medical-diss.com/docreader/269032/a/#?page=1> [Kal'nitskaya O.I. Veterinarno-sanitarnyy kontrol' ostatocnykh kolichestv antibiotikov v syr'e i produktakh zhivotnogo proiskhozhdeniya. Doktorskaya dissertatsiya. Moscow: 2008. <http://medical-diss.com/docreader/269032/a/#?page=1> (in Russian)]
60. Статья 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. N 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». <https://docs.cntd.ru/doc->

- ument/1200101976 [Stat'ya 26 Federal'nogo zakona ot 29 iyunya 2015 g. N 162-FZ «O standartizatsii v Rossijskoj Federatsii». <https://docs.cntd.ru/document/1200101976> (in Russian)]
61. Национальный Стандарт Российской Федерации: молоко и молочное сырье. Определение наличия остаточного содержания антибиотиков и лекарственных веществ иммунологическими методами. ГОСТ Р 59507-2021 <https://docs.cntd.ru/document/1200179603> [Natsional'nyj Standart Rossijskoj Federatsii: moloko i molochnoe syr'e. Opredelenie nalichiya ostatocnogo soderzhaniya antibiotikov i lekarstvennykh veshchestv immunologicheskimi metodami. GOST R 59507-2021 <https://docs.cntd.ru/document/1200179603> (in Russian)]
 62. ГОСТ 33526-2015. Межгосударственный стандарт — молоко и продукты переработки молока. Методика определения содержания антибиотиков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. 2016-07-01. <https://docs.cntd.ru/document/1200127446> [ГОСТ 33526-2015. Mezhgosudarstvennyj standart — moloko i produkty pererabotki moloka. Metodika opredeleniya soderzhaniya antibiotikov metodom vysokoeffektivnoj zhidkostnoj khromatografii. 2016-07-01. <https://docs.cntd.ru/document/1200127446> (in Russian)]
 63. AOAC. Official Method 995.04, Multiple tetracycline residues in milk, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th ed., 2012. https://members.aoc.org/AOAC_Docs/OMA/OMA19Revisions.pdf.
 64. Valenca L.M., de Pavia J. do E., Barbosa S.B.P., Pinheiro I.O., Batista Á.M.V., da Silva M.J.F.B. et al. Evaluation of residues of β -lactam, sulfonamide, tetracycline, quinolone, fluoroquinolone e pyrimidine in raw milk. Food Sci Technol (Campinas). 2021; 41 (3): 603–606. doi: 10.1590/fst.23520.
 65. Izzo L., Rodríguez-Carrasco Y., Tolosa J., Graziani G., Gaspari A., Ritieni A. Target analysis and retrospective screening of mycotoxins and pharmacologically active substances in milk using an ultra-high-performance liquid chromatography/ high-resolution mass spectrometry approach. J Dairy Sci. 2020; 103: 1250–1260. doi: 10.3168/jds.2019-17277.
 66. Gajda A., Nowacka-Kozak E., Gblylik-Sikorska M., Posyniak A. Tetracycline antibiotics transfer from contaminated milk to dairy products and the effect of the skimming step and pasteurisation process on residue concentrations. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2018; 35 (1): 66–76. doi: 10.1080/19440049.2017.1397773.
 67. Sarkar D.J., Mukherjee L., Shakil N.A., Rana V.S., Kaushik P., Debnath S. Antibiotics in Agriculture: Use and Impact. Indian Journal of Ethnopharmacology (IJEPP) 2018; 4 (1): 4–19. <https://www.researchgate.net/publication/325010472>
 68. <http://static.government.ru/media/files/onJ3GY3ObDGqLDvrED7AhpLF3ywRRFpp.pdf>

Информация об авторах

Олсуфьева Евгения Николаевна — д. х. н., профессор, главный научный сотрудник Лаборатории химической трансформации антибиотиков Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-2598-913X. Scopus Author ID: 35595443300. WOS Research ID: B-1230-2017. РИНЦ Ausr ID: 57864

Янковская Валентина Сергеевна — к. т. н., доцент кафедры управления качеством и товароведения продукции Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Российского государственного аграрного университета — МСХА им. К. А. Тимирязева (РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева), Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-2801-380X. ResearcherID: AAR-2725-2021. eLIBRARY SPIN-код: 2926-6979. AuthorID: 562520. ScopusAuthor ID: 57195148578

Дунченко Нина Ивановна — д. т. н., профессор, заведующий кафедрой управления качеством и товароведения продукции Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Российского государственного аграрного университета — МСХА им. К. А. Тимирязева (РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева), Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-6158-9854. ResearcherID: A-4774-2016. eLIBRARY SPIN-код: 3871-5198; AuthorID: 315962. ScopusAuthor ID: 57209540079

About the authors

Eugenia N. Olsufyeva — D. Sc. in chemistry, Professor, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2598-913X. Scopus Author ID: 35595443300. WOS Research ID: B-1230-2017. RSCI Ausr ID: 57864

Valentina S. Yankovskaya — Ph. D. in technical sciences, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-2801-380X. ResearcherID: AAR-2725-2021. eLIBRARY SPIN: 2926-6979. AuthorID: 562520 ScopusAuthor ID: 57195148578

Nina I. Dunchenko — D. Sc. in technical sciences, Professor, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-6158-9854. Researcher ID: A-4774-2016. eLIBRARY SPIN: 3871-5198; AuthorID: 315962 ScopusAuthor ID: 57209540079

