

ISSN 0235-2990

Антибиотики и Химиотерапия

Том 68

7-8'2023



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 2023

Свободная цена

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 68

7–8'2023

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. 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:
Ph. D. in Biology L. B. Smirnova
Proofreader: E. A. Krykova
Translator: Olga S. Smirnova
Website:
www.antibiotics-chemotherapy.ru

Advertising Department:

Tel.: 89254723038
E-mail: gncajournal@yandex.ru
L. 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 «Litera»

Release Date: August 2023
Free price

ISSN 0235-2990

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

ANTIBIOTIKI i KHIMIOTERAPIYA

Volume 68

7-8'2023

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 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)

Экспериментальные статьи

Цибизова А. А., Ясеняевская А. Л., Тюренков И. Н.,
Озеров А. А., Самотруева М. А.

Определение антиэшерихиозной активности производного пиримидина 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он

Баймиеv Ал. Х., Чуваткина А. К., Владимирова А. А.,
Матниязов Р. Т., Мавзютов А. Р., Баймиеv А. Х.

Анализ механизмов антибактериального действия экстрактов лекарственных растений с использованием системы двойных репортеров Dualrep2

Шаповалова В. В., Чулкова П. С., Агеевец В. А.

Анализ плазмид комплекса *Klebsiella pneumoniae*, несущих кластер генов синтеза аэробактина, представленных в международных базах данных

Гамалей С. Г., Скарнович М. О., Макаревич Е. В.,
Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н.,

Иванова О. С., Левагина Г. М., Даниленко Е. Д.

Противовирусная активность композиционного препарата дрожжевой двусpirальной РНК и интерферона альфа на модели экспериментальной гриппозной инфекции мышей

Клинические исследования и практика

Абдуллаев Ш. П., Маммаев К. М.-Б., Денисенко Н. П.,
Темирбулатов И. И., Качанова А. А., Михайленко Е. В.,

Крюков А. В., Валиев Т. Т., Мирзаев К. Б.,
Маммаев С. Н., Сычев Д. А.

Анализ распределения генетических факторов, ассоциированных с тяжёлым течением COVID-19, в этнических группах Восточного Кавказа

Говорова Н. В., Цилина С. В., Хиленко И. А.,
Резых В. В., Орлов Ю. П.

Купирование токсических эффектов кислорода сукцинатами у пациентов с COVID-19 при высокопоточной оксигенотерапии

Моллаева М. Р., Яббаров Н. Г., Сокол М. Б.,
Чиркина М. В., Никольская Е. Д.

Оценка синергетического эффекта комбинации доксорубицина и вориностата в отношении опухолевых клеток молочной железы с помощью модели Loewe

Альменко М. А., Валиев Р. Ш., Валиев Н. Р.,
Трагира И. Н., Полоников А. В., Балобанова Н. П.,

Батищев А. В., Коломиец В. М., Маль Г. С.,
Волкова С. Н., Козлов В. В.,
Сусликова Е. И., Попова Е. В.

Влияние полиморфизма гена *MDR1* (*ABCB1*) на риск развития гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких

Обзоры

Сизикова Т. Е., Лебедев В. Н., Борисевич С. В.

Оценка эффективности новых неспецифических средств медицинской защиты в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок

Данилов А. И., Евсеев А. В., Авдеева Т. Г.,
Легонькова Т. И., Жаркова Л. П.

Изменение этиологической структуры и особенности выбора антибактериальной терапии при инфекционном эндокардите в педиатрической практике

Яковлев С. В., Суторова М. П.

Ренессанс спирамицина в клинической практике

Крюков А. В., Новиков А. А., Купчик Б. М., Коровин Е. В.,
Яковлев С. В., Кузнецова Е. В., Каменева Т. Р.,

Ларюшина Е. Д., Журавлева М. В.

Оптимизация затрат на лекарственные препараты с использованием систем поддержки принятия решений на основе принципов доказательной медицины

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

Original Articles

4 Tsibizova Alexandra A., Yasenyavskaya Anna L.,
Tyurenkov Ivan N., Ozerov Alexander A., Samotrueva Marina A.
Determination of the Anti-Escherichial Activity
of the Pyrimidine Derivative 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3H)-one

11 Baymiev Alexey Kh., Chuvatkina Anna K.,
Vladimirova Anastasiya A., Matniyazov Rustam T.,
Mauzyutov Ayrat R., Baymiev Andrey Kh.

17 Analysis of Antibacterial Action Mechanisms of Medicinal Plant
Extracts Using Dual Reporter System Dualrep2
Shapovalova Vleriya V., Chulkova Polina S., Ageevets Vladimir A.
Analysis of Plasmids of the *Klebsiella pneumoniae*
Complex Carrying a Cluster of Aerobactin Synthesis Genes
as Presented in International Databases

27 Gamalei Svetlana G., Skarnovich Maxim O.,
Makarevich Elena V., Mazurkov Oleg Yu.,
Shishkina Larisa N., Ivanova Olga S.,
Levagina Galina M., Danilenko Elena D.
Antiviral Activity of Double-Stranded Ribonucleic Acid
and Interferon Alpha Composition in the Model
of Experimental Influenza Infection of Mice

34 Clinical Research and Practice
Abdullaev Sherzod P., Mammaev Kamal M.-B.,
Denisenko Natalia P., Temirbulatov Ilyas I.,
Kachanova Anastasia A., Mikhaylenko Elizaveta V.,
Kryukov Alexander V., Valiev Timur T., Mirzaev Karin B.,
Mammaev Suleiman N., Sychev Dmitry A.
Distribution of Genetic Factors Associated with Severe COVID-19
in Ethnic Groups of the Eastern Caucasus

42 Govorova Natalya V., Tsilina Svetlana V., Khilenco Irina A.,
Rezuykh Vikror V., Orlov Yurii P.
Relief from Toxic Effects of Oxygen Using Succinates
in Patients with COVID-19 Undergoing High-Flow
Oxygen Therapy

53 Mollaeva Mariia R., Yabbarov Nikita G., Sokol Mariya B.,
Chirkina Margarita V., Nikolskaya Elena D.
Evaluation of the Synergistic Effect of the Combination
of Doxorubicin and Vorinostat on Breast Tumor Cells
Using the Loewe Model

62 Alymenko Maxim A., Valiev Ravil Sh., Valiev Nail R.,
Tragira Irina N., Polonikov Alexey V., Balobanova Natalya P.,
Batishchev Alexander V., Kolomiets Vladislav M., Mal Galina S.,
Volkova Svetlana N., Kozlov Vasiliy V., Suslikova Elena I.,
Popova Elizaveta V.
The Effect of Polymorphism of the *MDR1* (*ABCB1*) Gene
on the Risk of Hepatotoxic Reactions in Patients
with Pulmonary Tuberculosis

Reviews
70 Sizikova Tatiana E., Lebedev Vitaliy N., Borisevich Sergey V.
The Estimation of Efficacy
of Nonspecific Medications Against Hemorrhagic
Fever Caused by Arenaviruses

78 Danilov Andrey I., Evseev Andrey V., Avdeeva Tatiana G.,
Legonkova Tatiana I., Zharkova Lyudmila P.
Changes in the Etiological Structure
and Specifics When Choosing Antibacterial Therapy
Against Infective Endocarditis
in Pediatric Practice

83 Yakovlev Sergey V., Suvorova Margarita P.
The Renaissance of Spiramycin in Clinical Practice

90 Kryukov Alexander V., Novikov Anton A.,
Kupchik Boris M., Korovin Evgeniy V., Yakovlev Sergey V.,
Kuznetsova Elena V., Kameneva Tatiana R.,
Laryushkina Elena D., Zhuravleva Marina V.
Drug Cost Optimization Using Evidence-Based
Decision Support Systems

* 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.

Определение антиэшерихиозной активности производного пиридинина 3-[2-[(4,6-диметилпиридин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он

А. А. ЦИБИЗОВА¹, *А. Л. ЯСЕНЯВСКАЯ¹, И. Н. ТЮРЕНКОВ²,
А. А. ОЗЕРОВ², М. А. САМОТРУЕВА¹

¹ Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

² Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Determination of the Anti-Escherichial Activity of the Pyrimidine Derivative 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3H)-one

ALEXANDRA A. TSIBIZOVA¹, *ANNA. L. YASENYAVSKAYA¹, IVAN N. TYURENKO²,
ALEXANDR A. OZEROV², MARINA. A. SAMOTRUEVA¹

¹ Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

² Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Резюме

Цель исследования — изучение противомикробной активности производного пиридинина 3-[2-[(4,6-диметилпиридин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он в отношении *Escherichia coli*. Изучение противомикробной активности проводили в условиях *in vitro* путём серийных разведений пиридининового соединения с последующим определением минимальной подавляющей концентрации 3-[2-[(4,6-диметилпиридин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он (VMA-13-14) и *in vivo* на модели генерализованной эшерихиозной инфекции. Исследование противомикробной активности в условиях *in vivo* проводили на 40 мышах линии СВА массой 19–20 г. Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с требованиями нормативной документации, регламентирующей содержание лабораторных животных и работу с ними. Противомикробную активность пиридининового соединения 3-[2-[(4,6-диметилпиридин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он в отношении *E. coli* в условиях *in vitro* оценивали по показателям выживаемости мышей, обсеменённости крови и внутренних органов (печень, селезёнка, лёгкие, головной мозг), а также общего количества лейкоцитов и лейкограммы. В эксперименте установлено, что пиридининовое соединение 3-[2-[(4,6-диметилпиридин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он оказывает противомикробную активность в отношении *E. coli*: в условиях *in vitro* оказывает бактерицидное действие в концентрации 128 мкг/мл; в условиях *in vivo* оказывает противомикробное действие в условиях генерализованной инфекции при введении 50 мг/кг/сут в течение 10 дней. Противомикробный эффект 3-[2-[(4,6-диметилпиридин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он сопоставим с цефазидимом, который является препаратом выбора при лечении эшерихиозной инфекции.

Ключевые слова: *Escherichia coli*; генерализованная эшерихиозная инфекция; бактерицидная активность; противомикробная активность

Для цитирования: Цибизова А. А., Ясеняевская А. Л., Тюренков И. Н., Озеров А. А., Самотруева М. А. Определение антиэшерихиозной активности производного пиридинина 3-[2-[(4,6-диметилпиридин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он. Антибиотики и химиотер. 2023; 68: 7–8: 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-4-10>.

Abstract

The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of the pyrimidine derivative 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3H)-one against *Escherichia coli*. The study of antimicrobial activity was carried out *in vitro* by serial dilutions of the pyrimidine compound, followed by determination of the minimum inhibitory concentration of 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3n)-one (VMA-13-14) and *in vivo* on the model of generalized *E. coli* infection. The study of antimicrobial activity *in vivo* was carried out on 40 CBA mice weighing 19–20 g. All manipulations with animals were performed in accordance with the requirements of the regulatory documentation governing the maintenance of laboratory animals and work involving them. The antimicrobial activity of the pyrimidine compound 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3H)-one against *E. coli* *in vitro* was evaluated in terms of mouse survival, contamination of blood and internal organs (liver, spleen, lungs, brain), as well as the total number of leukocytes and leukograms. The experiment determined that the pyrimidine compound 3-[2-[(4,6-di-

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: Бакинская ул., 121. Астраханский ГМУ, г. Астрахань, Россия. E-mail: yasen_9@mail.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 121 Bakinskaya st., Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia. E-mail: yasen_9@mail.ru

*methylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3n)-one demonstrates antimicrobial activity against *E.coli*: *in vitro*, it has a bactericidal effect at a concentration of 128 μ g/ml; *in vivo*, it has an antimicrobial effect in conditions of generalized infection with the introduction of 50 mg/kg/day for 10 days. The antimicrobial effect of 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3n)-one is comparable to ceftazidime, which is the drug of choice in the treatment of *E.coli* infection.*

Keywords: *Escherichia coli; generalized escherichial infection; bactericidal activity; antimicrobial activity*

For citation: Tsibizova A. A., Yasenyavskaya A. L., Tyurenkov I. N., Ozerov A. A., Samottrueva M. A. Determination of the anti-escherichial activity of the pyrimidine derivative 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3H)-one. *Antibiotiki i Khimioter* = *Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 7-8: 4-10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-4-10>.

Введение

В настоящее время одной из ведущих проблем медицины является возникновение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, что существенно затрудняет лечение инфекционно-воспалительных заболеваний бактериальной этиологии [1, 2]. Развитие антибиотикорезистентности, опосредованной, в частности, неконтролируемым применением антибактериальных средств, определяется формированием молекулярных механизмов резистентности через точечные хромосомные мутации и/или горизонтальный перенос генетического материала между видами, что в ещё большей степени усугубляет терапевтическую ситуацию [3, 4]. В течение последних десятилетий наблюдается рост как внебольничных, так и внутрибольничных инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами *Escherichia coli*. На сегодняшний день установлено, что кишечная палочка имеет высокий процент устойчивости к ампициллину, триметоприму, сульфаметоксазолу, тетрациклину, хлорамфениколу и налидиксовой кислоте, что обеспечивает возникновение сложностей в подборе оптимального антибактериального препарата [5, 6]. В связи с чем разработка новых препаратов с противомикробной активностью в отношении *E.coli* является актуальной задачей. В качестве средств с указанной активностью могут быть предложены производные пиримидина. В настоящее время при разработке лекарственных средств широко используются пиримидиновые соединения, что определено их относительной безопасностью в отношении организма в целом, а также принадлежностью к группе малотоксичных соединений [7-9]. Установлено, что пиримидиновые соединения используются при производстве различных лекарственных средств на основе гетероциклов с различной фармакологической активностью: антигипертензивной, противоопухолевой, противовоспалительной и антиоксидантной, а также противомикробной [10, 11].

В связи с чем целью работы явилось изучение противомикробной активности производного пиримидина 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)аминол]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он в отношении *E.coli*.

Материал и методы

Изучение противомикробной активности проводили в условиях *in vitro* путём серийных разведений пиримидинового соединения с последующим определением минимальной подавляющей концентрации 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)аминол]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3n)-он (VMA-13-14) и *in vivo* на модели генерализованной эшерихиозной инфекции.

Наличие противомикробной активности в условиях *in vitro* в отношении *E.coli* определяли путём проведения серийных разведений исследуемого соединения 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)аминол]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он, согласно требованиям международного стандарта ISO 20776-1:2006 и ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. В исследовании использовали клинический штамм *E.coli*, выделенный из мочи пациентов с хроническим пиелонефритом, проходивших лечение в стационарных условиях ГБУЗ АО «ГКБ №3» (г. Астрахань). Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью микробиологического анализатора BIOMIC V3 («Giles Scientific», США).

Рабочий раствор исследуемого соединения готовили путём его растворения (4 мг) в 0,5 мл диметилсульфоксида, добавляя 4,5 мл физиологического раствора. Выбор диметилсульфоксида обусловлен методическими рекомендациями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, а также нерастворимостью производного пиримидина в воде и малой растворимостью в этиловом спирте. Полученный раствор с концентрацией 800 мкг/мл разводили с коэффициентом 2 по убывающей в геометрической прогрессии концентрациями от 128 до 0,25 мкг/мл. В качестве препарата сравнения использовали Цефтаzидим (ОАО «Красфарма», Россия), разведения которого готовили аналогично исследуемому соединению.

Приготовленную суспензию *E.coli* в объёме 1 мл вносили в пробирки с раствором производного пиримидина и цефтаzидима, после чего центрифугировали (1500 об/мин) в течение 10 мин. Полученный осадок использовали для посева *E.coli* на мясопептонный агар (МПА) в чашках Петри и инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C, после чего устанавливали минимальную подавляющую концентрацию (МПК). Наличие противомикробной активности у пиримидинового соединения 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)аминол]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он в условиях *in vitro* оценивали по наличию задержки роста микроорганизма.

Наличие противомикробной активности у пиримидинового соединения 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)аминол]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он в условиях *in vitro* оценивали по наличию задержки роста микроорганизма на чашках Петри и по количеству колоний. В качестве контроля использовали чашки Петри с *E.coli*, внесёнными в МПА. Посевы были выполнены в пятикратной повторности.

Исследование противомикробной активности в условиях *in vivo* проводили на 40 мышах линии СВА массой 19–20 г. Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с требованиями нормативной документации, регламентирующей содержание лабораторных животных и работу с ними. Во время эксперимента животные были разделены на четыре группы: «контроль» — мыши, получавшие внутрибрюшинно

воду очищенную в эквивалентном объёме раствору изучаемого соединения; «инфекция» — группа, состоящая из инфицированных животных, не получавших лечение; «опыт 1» — инфицированные мыши, которым в качестве лечения вводили пиразиномное соединение в дозе 50 мг/кг/сут (доза сопоставима со средней терапевтической дозой препарата сравнения) в течение 10 дней и «опыт 2» — животные, которым вводили в качестве терапевтического агента препарат сравнения — цефазидим в дозе 50 мг/кг/сут, составляющую среднюю терапевтическую дозу, в течение 10 дней. Генерализованную инфекцию воспроизводили путём внутрибрюшинного введения *E.coli* в 0,5 мл раствора натрия хлорида 0,9% в дозе 4×10⁶. Инфицирующая доза *E.coli* была определена в предварительных исследованиях. Проводимые исследования одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации» (протокол № 6 от 27.11.2018 г.).

Противомикробную активность пиразиномового соединения 3-[2-[(4,6-диметилпиразин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он в отношении *E.coli* в условиях *in vitro* оценивали по показателям выживаемости мышей, обсеменённости крови и внутренних органов (печень, селезёнка, лёгкие, головной мозг), а также общего количества лейкоцитов и лейкоцитограммы.

Нормальность распределения количественных признаков проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Количественные показатели описывали средними значениями (*M*) и стандартными ошибками среднего (*m*), в виде *M±m*. Категориальные показатели представлены абсолютными и относительными (в %) частотами. Различия количественных показателей в двух независимых группах оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез считали *p*=0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения антишерихиозной активности 3-[2-[(4,6-диметилпиразин-2-ил)амино]-2-

оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он в условиях *in vitro* показаны в табл. 1.

При проведении исследования противомикробной активности VMA-13-14 в отношении *E.coli* было установлено, что данное соединение в концентрациях 0,25 мкг/мл и 0,5 мкг/мл является неактивным, в концентрациях 1–4 мкг/мл — малоактивным, в разведении 8 мкг/мл — показывает среднюю активность, в концентрациях 16–64 мкг/мл — активно подавляет рост микробов, а в концентрации 128 мкг/мл — практически полностью подавляет рост *E.coli*. Аналогичная тенденция наблюдается и при исследовании антишерихиозной активности препарата сравнения — цефазидима.

В табл. 2 указаны МПК 3-[2-[(4,6-диметилпиразин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он и цефазидима.

Установлено, что VMA-13-14 и цефазидим в концентрациях 8 и 4 мкг/мл оказывают бактериостатическую активность, в концентрациях 128 и 64 мкг/мл — бактерицидную.

При подсчёте числа колоний было установлено, что в сравнении с контролем VMA-13-14 в концентрациях от 1 до 128 способствует снижению их количества в 2,3–32 раза (*p*<0,001); препарат сравнения в концентрациях от 2 до 128 мкг/мл снижает количество колоний *E.coli* в 2,5–45 раз (*p*<0,001).

При изучении противомикробной активности производного пиразина VMA-13-14 было установлено, что развитие генерализованной

Таблица 1. Оценка антишерихиозной активности 3-[2-[(4,6-диметилпиразин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он

Table 1. Evaluation of 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3H)-one activity against <i>E.coli</i>					
Соединение, мкг/мл	Визуальный результат	Количество колоний	Соединение, мкг/мл	Визуальный результат	Количество колоний
Контроль	++++	691,01±42,10	Контроль	++++	691,01±42,10
VMA-13-14	—	21,24±1,21***	Цефазидим	—	15,41±1,40***
128	—	21,24±1,21***	128	—	15,41±1,40***
64	+	68,56±4,12***	64	—	22,57±2,01***
32	+	69,74±3,67***	32	+	58,69±3,78***
16	+	77,45±4,59***	16	+	73,27±4,23***
8	++	97,41±6,74***	8	+	83,89±5,26***
4	+++	234,29±15,43***	4	++	112,93±6,84***
2	+++	258,98±17,84***	2	+++	273,81±17,68***
1	+++	301,67±21,61***	1	++++	598,76±32,18
0,5	++++	639,52±31,63	0,5	++++	623,21±33,72
0,25	++++	687,74±34,18	0,25	++++	672,25±39,56

Примечание. «—» — разведение высокоактивное (отсутствие характерного роста/или наличие единичных колоний); «+» — разведение активное (характерный рост менее 25%); «++» — разведение среднеактивное (характерный рост от 25 до 50%); «+++» — разведение малоактивное (характерный рост от 50 до 75%); «++++» — разведение неактивное (характерный рост более 75%); сравнение с группой «контроль»: * — *p*<0,05; ** — *p*<0,01; *** — *p*<0,001.

Note. «—» — highly active dilution (lack of characteristic growth/or presence of single colonies); «+» — active dilution (characteristic growth is less than 25%); «++» — medium active dilution (typical growth from 25 to 50%); «+++» — mildly active dilution (typical growth from 50 to 75%); «++++» — inactive dilution (typical growth of more than 75%); comparison with the control group: * — *P*<0.05; ** — *P*<0.01; *** — *P*<0.001.

Таблица 2. Минимальные подавляющие концентрации 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3н)-он в отношении штаммов *E.coli* (мкг/мл)

Table 2. Minimum inhibitory concentrations of 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3n)-one against *E.coli* strains (μg/mL)

Изучаемое соединение	МПК ₅₀	МПК ₉₀₋₁₀₀
VMA-13-14	8	128
Цефтазидим	4	64

Примечание. МПК₅₀ — концентрация, подавляющая рост *E.coli* относительно контроля на 50% (бактериостатическая активность); МПК₉₀₋₁₀₀ — концентрация, подавляющая рост *E.coli* относительно контроля на 90–100 % (бактерицидная активность).

Note. МПК₅₀ — concentration that inhibits the growth of *E.coli* growth by 50% relative to the control (bacteriostatic activity); МПК₉₀₋₁₀₀ — concentration that inhibits the growth of *E.coli* growth relative to control by 90–100% (bactericidal activity).

эшерихиозной инфекции в первые двое суток сопровождалось снижением аппетита и двигательной активности у животных, избыточным потреб-

лением воды, повышением температуры тела (в среднем на 7,6%).

Результаты оценки влияния пиримидинового производного 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3н)-он на выживаемость животных показаны в табл. 3.

Анализ выживаемости мышей в условиях генерализованной эшерихиозной инфекции показал, что в группе «инфекция» к 10-м суткам отмечалась гибель животных и количество выживших составило 30%; в группе «опыт 1» процент выживших животных составил 90%, в группе «опыт 2» — 80%.

Результаты влияния пиримидинового производного 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3н)-он на общее количество лейкоцитов и показатели лейкограммы представлены в табл. 4.

Развитие инфекции способствовало увеличению общего количества лейкоцитов практически в 4 раза ($p<0,001$) по сравнению с контрольной группой животных; на фоне введения

Таблица 3. Влияние 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3н)-он на выживаемость мышей в условиях генерализованной эшерихиозной инфекции

Table 3. Effect of 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3n)-one on the survival of mice under the conditions of generalized *E.coli* infection

Дни эксперимента	Показатель	Экспериментальные группы мышей (n=10)			
		контроль (вода/инъекц.)	инфекция	опыт 1 (VMA-13-14)	опыт 2 (цефтазидим)
1	Выживаемость, %	100	100	100	100
2		100	100	100	90
3		100	80	90	80
4		100	80	90	80
5		100	70	90	80
6		100	60	90	80
7		100	50	90	80
8		100	40	90	80
9		100	40	90	80
10		100	30	90	80

Таблица 4. Влияние 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3н)-он на общее количество лейкоцитов и показатели лейкограммы мышей в условиях генерализованной эшерихиозной инфекции

Table 4. Effect of 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3n)-one on the total number of leukocytes and leukogram parameters in mice under conditions of generalized *E.coli* infection

Показатели	Экспериментальные группы мышей (n=10)			
	контроль (вода/инъекц.)	инфекция	опыт 1 (VMA-13-14)	опыт 2 (цефтазидим)
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9$	7,21 \pm 0,81	28,69 \pm 2,41***	10,57 \pm 1,03##	11,68 \pm 1,28##
Эозинофилы, %	1,23 \pm 0,04	2,00 \pm 0,02***	1,88 \pm 0,27	1,82 \pm 0,03
Палочкоядерные нейтрофилы, %	2,35 \pm 0,32	19,79 \pm 1,12***	5,96 \pm 0,67###	7,36 \pm 0,83###
Сегментоядерные нейтрофилы, %	49,63 \pm 2,62	36,95 \pm 3,41*	48,40 \pm 3,54#	47,90 \pm 2,67#
Моноциты, %	2,64 \pm 0,34	5,28 \pm 0,35***	3,87 \pm 0,05##	4,08 \pm 0,03##
Базофилы, %	0,2 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03	0,22 \pm 0,03	0,20 \pm 0,01
Лимфоциты, %	43,95 \pm 3,41	35,69 \pm 3,01	39,67 \pm 3,27	38,64 \pm 2,84

Примечание. Сравнение с группой «контроль»: * — $p<0,05$; ** — $p<0,01$; *** — $p<0,001$; сравнение с группой «инфекция»: # — $p<0,05$; ## — $p<0,01$; ### — $p<0,001$.

Note. Comparison with the control group: * — $P<0.05$; ** — $P<0.01$; *** — $P<0.001$; comparison with the infection group: # — $P<0.05$; ## — $P<0.01$; ### — $P<0.001$.

пиrimидинового соединения и препарата сравнения данный показатель снизился относительно группы «инфекция» в 2,7 и 2,5 раза ($p<0,01$), соответственно.

При анализе лейкограммы было установлено, что эшерихиозная инфекция не вызывала статистически значимых изменений у базофилов и лимфоцитов, однако количество эозинофилов, палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов увеличилось в 1,6, 8,4 и 2 раза ($p<0,001$), соответственно, тогда как количество сегментоядерных нейтрофилов снизилось в 1,3 раза ($p<0,05$), что свидетельствует о сдвиге лейкоцитарной формулы влево и развитии инфекционно-воспалительного процесса.

При введении пиrimидинового соединения и цефтазидима количество эозинофилов, базофилов и лимфоцитов практически не изменилось, тогда как количество сегментоядерных нейтрофилов повысилось в 1,3 раза ($p<0,05$), а палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов уменьшилось в 3,3 и 2,7 раза ($p<0,001$), в 1,4 и 1,3 раза ($p<0,01$), соответственно, что свидетельствует о снижении активности инфекционно-воспалительного процесса.

Результаты анализа микробной обсеменённости *E.coli* крови и внутренних органов в условиях генерализованной эшерихиозной инфекции показаны в табл. 5.

В эксперименте установлено, что при формировании эшерихиозной инфекции было отмечено наличие *E.coli* в крови, печени и лёгких, тогда как лечение VMA-13-14 и препаратом сравнения в течение 10 дней способствовало более полной элиминации микроорганизмов из крови и внутренних органов мышей.

Принимая во внимание полученные результаты, можно сделать вывод, что пиrimидиновое соединение 3-[2-[(4,6-диметилпиrimидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он оказывает противомикробную активность в отношении *E.coli*: в условиях *in vitro* оказывает бактерицидное действие в концентрации 128 мкг/мл; в условиях *in vivo* оказывает противомикробное действие в условиях генерализованной инфекции

при введении 50 мг/кг/сут в течение 10 дней. Противомикробный эффект 3-[2-[(4,6-диметилпиrimидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он сопоставим с цефтазидимом, который является препаратом выбора при лечении эшерихиозной инфекции.

В научных исследованиях приведены данные, характеризующие наличие у производных пиrimидина противомикробной активности в отношении *E.coli*. Так, в эксперименте доказано антибактериальное действие производных бензо-тиазолпиrimидина, терапевтический эффект которых связан с наличием электроноакцепторных заместителей в ароматическом кольце [12, 13]. Были разработаны и синтезированы два новых класса ингибиторов *E.coli* PDHc-E1 производные амида и мочевины. Амидные производные соединения с 4-NO₂ в бензольном кольце показали более мощное ингибирование *E.coli* PDHc-E1, что связывают с наличием двух водородных связей, образованных двумя NH мочевины. Производные мочевины проявляли менее выраженную противомикробную активность, чем соответствующие амидные производные с тем же заместителем [13]. Синтезированы новые пиrimидиновые соединения 2,6-бис(4,6-диметилпиrimидин-2-илтио)бензол-1,4-диола, 3,5-бис(4,6-диметилпиrimидин-2-илтио)-2-метилбензол-1,4-диола и 3,5-бис(4,6-диметилпиrimидин-2-илтио)-2-метоксибензол-1,4-диола, обладающие противомикробным действием в отношении кишечной палочки при МПК соединения 125 мкг/мл [14]. Установлено, что новые производные хиназолин-4(3Н)-она проявляют по отношению к *E.coli* бактериостатический эффект, который обусловлен их полярностью за счёт присутствия в молекуле замещённой амидной группы, связанной с хиназолиновой основой [15].

Анализ научных источников показал, что пиrimидиновое кольцо является одним из наиболее важных гетероциклических каркасов, определяющих противомикробную активность, за счёт конкурентного ингибирования ферментов дигидроптероатсингазы, дигидрофолатредуктазы или глюкозамин-N-фосфатсингазы, проду-

Таблица 5. Влияние 3-[2-[(4,6-диметилпиrimидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он на обсеменённость *E.coli* внутренних органов и крови в условиях генерализованной эшерихиозной инфекции
Table 5. Effect of 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3n)-one on *E.coli* contamination of internal organs and blood under conditions of generalized *E.coli* infection

Исследуемые органы	Экспериментальные группы мышей (n=10)			
	контроль (вода/инъек.)	инфекция	опыт 1 (VMA-13-14)	опыт 2 (цефтазидим)
Кровь	—	+	—	—
Печень	—	+	—	—
Селезёнка	—	—	—	—
Лёгкие	—	+	—	—
Головной мозг	—	—	—	—

цирующихся у бактерий, но не экспрессирующихся у большинства эукариот, что и определяет их как мишень для антибиотиков [16].

Заключение

Таким образом, пиримидиновое производное 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3н)-он оказывает противомикробную активность в отношении *E.coli*, проявляя бактерицидное действие в концентрации 128 мкг/мл в условиях *in vitro* и антибактериаль-

ное действие, сопоставимое с препаратом сравнения цефтазидимом, в условиях генерализованной инфекции при введении 50 мг/кг/сут в течение 10 дней.

Финансирование. Научная статья выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ в части проведения НИР по теме «Поиск и разработка перспективных соединений с антибактериальной активностью среди производных пиримидина для создания лекарственных препаратов» 48.2-2021.

Литература/References

1. MacGowan A., Macnaughton E. Antibiotic resistance. Medicine. 2017; 10 (45): 622–628. doi: 10.1016/j.mpmed.2017.07.006.
2. Frieri M., Kumar K., Boutin A. Antibiotic resistance. J Infect Public Health. 2017; 10 (4): 369–378. doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.
3. Zaman S.B., Hussain M.A., Nye R., Mehta V., Mamun K.T. et al. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. Cureus. 2017; 9 (6): e1403. doi: 10.7759/cureus.1403.
4. Chokshi A., Sifri Z., Cennimo D., Horng H. Global Contributors to antibiotic resistance. J Glob Infect Dis. 2019; 11(1): 36–42. doi: 10.4103/jgid.jgid_110_18.
5. Lee D.S., Lee S.-J., Choe H.-S. Community-acquired urinary tract infection by *Escherichia coli* in the era of antibiotic resistance. BioMed Res Int. 2018; 2018: 7656752. doi: 10.1155/2018/7656752.
6. O'Flaherty E., Borrego C.M., Balcázar J.L., Cummins E. Human exposure assessment to antibiotic-resistant *Escherichia coli* through drinking water. Sci Total Environ. 2018; 616–617: 1356–1364. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.180.
7. Rani J., Kumar S., Saini M., Mundlia J., Verma P. K. Biological potential of pyrimidine derivatives in a new era. Res Chem Intermed. 2016; 42: 6777–6804. doi:10.1007/s11164-016-2525-8.
8. Ajmal R. B. Biological activity of pyrimidine derivatives: a review. Organic & Medicinal Chem IJ. 2017; 2(2): 555581. doi: 10.19080/OMCJ.2017.02.555581.
9. Chiacchio M. A., Iannazzo D., Romeo R., Giofrè S. V., Legnani L. Pyridine and pyrimidine derivatives as privileged scaffolds in biologically active agents. Curr Med Chem. 2019; 40 (26): 7166–7195. doi: 10.2174/0929867325666180904125400.
10. Mallikarjunaswamy C., Mallesha L., Bhadregowda D. G., Pinto O. Studies on synthesis of pyrimidine derivatives and their antimicrobial activity. Arabian Journal of Chemistry. 2017; 10: 484–S490. doi: 10.1016/j.arabjc.2012.10.008.
11. Самотруева М. А., Озеров А. А., Старикова А. А., Габитова Н. М., Мережкина Д. В., Цибизова А. А. и др. Изучение антимикробной активности новых хиназолин-4(3н)-онов по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. Фармация и фармакология. 2021; 9 (4): 318–329. doi: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-4-318-329> [Samotrueva M. A., Ozerov A. A., Starikova A. A., Gabitova N. M., Merezhkina D. V., Tsibizova A. A. i dr. Izuchenie antimikrobnoy aktivnosti novykh khinazolin-4(3n)-onov po otosheniyu k Staphylococcus aureus i Streptococcus pneumoniae. Farmsiya i farmakologiya. 2021; 9 (4): 318–329. doi: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-318-329. (in Russian)]
12. Fesatidou M., Petrou A., Geronikakia A. Heterocycle compounds with antimicrobial activity. Curr Pharm Des. 2020; 26 (8): 867–904. doi: 10.2174/138161286666200206093815.
13. Maddila S., Gorleb S., Seshadri N., Lavanyad P., Jonnalagadda S. B. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of novel benzothiazole pyrimidine derivatives. Arabian Journal of Chemistry. 2016; 9: 681–687 doi: 10.1016/j.arabjc.2013.04.003.
14. Tret'yakova E. V., Salimova E. V., Parfenova L. V. Synthesis, modification, and biological activity of propargylated methyl dihydroquinopimarates. Nat Prod Res. 2022; 36 (1): 79–86. doi: 10.1080/14786419.2020.1762187.
15. Старикова, А. А., Габитова, Н. М.-К., Цибизова, А. А., Озеров А. А., Тюренков И. Н. и др. Изучение антимикробной активности новых производных хиназолин-4(3н)-она по отношению к *Echerichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Астраханский медицинский журнал. 2022; 1 (17): 60–71. doi: <https://doi.org/10.48612/agmu/2022.17.1.60.71>. [Starikova, A. A., Gabitova, N. M.-K., Cibizova, A. A., Ozerov A. A., Tyurenkov I. N. i dr. Izuchenie antimikrobnoj aktivnosti novykh proizvodnykh hinazolin-4(3n)-ona po otosheniyu k Echerichia coli i Klebsiella pneumoniae. Astrahanskij medicinskij zhurnal. 2022; 1 (17): 60–71. doi: [https://doi.org/10.48612/agmu/2022.17.1.60.71. \(in Russian\)\]](https://doi.org/10.48612/agmu/2022.17.1.60.71)
16. Elkani N. A. A., Bakr R. B. Microwave assisted, antimicrobial activity and molecular modeling of some synthesized newly pyrimidine derivatives using 1, 4-diazabicyclo[2.2.2]octane as a Catalyst. 2020; 12 (17): 1538–1551. doi: 10.2174/1570180817999200802033351.

Информация об авторах

Цибизова Александра Александровна — к. фарм. н., доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9994-4751

Ясеняевская Анна Леонидовна — к. м. н., доцент, руководитель Научно-исследовательского центра, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864

Тюренков Иван Николаевич — д. м. н., профессор, член-корреспондент Российской академии наук, заведующий кафедрой фармакологии и фармации Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования факультета усовершенствования врачей ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7574-3923

About the authors

Alexandra A. Tsibizova — Ph. D. in Pharmaceutics, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology, and Biotechnology of the Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9994-4751.

Anna L. Yasenyavskaya — Ph. D. in Medicine, Associate Professor, Head of the Research Center, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology, and Biotechnology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864.

Ivan N. Tyurenkov — D. Sc. in Medicine, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Pharmacology and Pharmacy of the Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education of the Faculty of Advanced Training of Doctors of the Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Volgograd, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7574-3923

Озеров Александр Александрович — д. хим. н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград, Россия. ORCID ID:0000- 0002-4721-0959

Самотруева Марина Александровна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0001-5336-4455.

Alexandr A. Ozerov — D. Sc. in Chemistry, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of the Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Volgograd, Russia. ORCID ID:0000- 0002-4721-0959

Marina A. Samottrueva — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology, and Biotechnology of the Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0001-5336-4455.

Анализ механизмов антибактериального действия экстрактов лекарственных растений с использованием системы двойных репортеров Dualrep2

*АЛ. Х. БАЙМИЕВ^{1,2}, А. К. ЧУВАТКИНА², А. А. ВЛАДИМИРОВА¹,
Р. Т. МАТНИЯЗОВ¹, [А. Р. МАВЗЮТОВ]², АН. Х. БАЙМИЕВ^{1,2}

¹ Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

² ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, Россия

Analysis of Antibacterial Action Mechanisms of Medicinal Plant Extracts Using Dual Reporter System Dualrep2

*ALEXEY KH. BAYMIEV^{1,2}, ANNA K. CHUVATKINA², ANASTASIYA A. VLADIMIROVA¹,
RUSTAM T. MATNIYAZOV¹, [AYRAT R. MAVZYUTOV]², ANDREY KH. BAYMIEV^{1,2}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

Резюме

Актуальность. Одной из основных проблем антибиотикотерапии является развитие резистентности у микроорганизмов. В связи с этим актуален поиск новых, природных антибиотиков, в том числе растительного происхождения. **Цель.** Определение механизмов антибактериального действия водных и спиртовых экстрактов лекарственных растений, собранных на территории Республики Башкортостан. **Материал и методы.** В качестве объектов исследования были взяты кора, корни, стебли, листья и соцветия лекарственных растений. Механизмы антибактериального действия препаратов растений определяли высокопроизводительным скринингом, используя систему двойных репортеров Dualrep2. **Результаты.** В результате проделанной работы были установлены механизмы антибактериального действия некоторых растительных экстрактов, полученных из свежего и высушенного сырья. Показано, что продукты спиртовой экстракции соцветий тысячелистника подавляют синтез белка, а корней и стеблей чистотела вызывают активацию SOS-системы репарации ДНК у бактерий *Escherichia coli*. **Заключение.** Полученные результаты позволяют рассматривать исследуемые экстракты лекарственных растений как основу для получения новых антибактериальных средств с определенным механизмом действия.

Ключевые слова: антибактериальный механизм; лекарственные растения; репортеры

Для цитирования: Баймiev Ал. Х. Чуваткина А. К., Владимирова А. А., Матниязов Р. Т., Мавзютов А. Р., Баймiev Ан. Х. Анализ механизмов антибактериального действия экстрактов лекарственных растений с использованием системы двойных репортеров Dualrep2. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68: 7–8: 11–16. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-11-16>.

Abstract

Background. One of the main problems of antibiotic therapy is the development of resistance in microorganisms. In this regard, the search for new natural antibiotics, including those of plant origin, is relevant. The aim of the study was the determination of antibacterial action mechanisms of aqueous and alcoholic extracts of medicinal plants collected on the territory of the Republic of Bashkortostan. **Methods.** The bark, roots, stems, leaves, and inflorescences of medicinal plants were selected as objects of the study. The mechanisms of antibacterial action of plant preparations were determined via high throughput screening using the Dualrep2 double reporter system. **Results.** The mechanisms of the antibacterial action of certain plant extracts obtained from fresh and dried raw materials were established. It has been shown that the products of alcohol extraction of yarrow inflorescences inhibit protein synthesis, while the products of celandine roots and stems cause the activation of the SOS DNA repair system in *Escherichia coli* bacteria. **Conclusion.** The results obtained allow us to consider the studied extracts of medicinal plants as a basis for obtaining new antibacterial agents with a specific mechanism of action.

Keywords: antibacterial mechanism; medicinal plants; reporters

For citation: Baymiev Al. Kh. Chuvatkina A. K., Vladimirova A. A., Matniyazov R. T., Mavzyutov A. R., Baymiev An. Kh. Analysis of antibacterial action mechanisms of medicinal plant extracts using dual reporter system Dualrep2. *Antibiotiki i Khimioter. = Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68: 7–8: 11–16. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-11-16>.

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: пр-кт Октября, д. 71. ИБГ УФИЦ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия, 450054. E-mail: baymiev@mail.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 71 Oktyabrya Ave., Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, 450054 Russia. E-mail: baymiev@mail.ru

Введение

Благодаря антибактериальным препаратам, медицина достигла больших успехов в лечение инфекционных заболеваний. Однако следует отметить, что синтетические антибиотики, широко используемые в настоящие времена, часто обладают побочными действиями [1]. Также из-за частого и порой бесконтрольного использования антибиотиков у патогенных микроорганизмов со временем развивается устойчивость к антибактериальным препаратам. В связи с этим актуален поиск новых, природных антибиотиков, в том числе растительного происхождения [2].

Лекарственные растения синтезируют огромный спектр вторичных метаболитов — алкалоиды, гликозиды, сапонины, терпеноиды, флаваноиды и фитонциды и др., оказывающие губительное действие на бактериальную клетку [3]. Многие лекарственные растения служат природными антибиотиками, которые подавляют рост бактерий, обладают бактерицидными действиями и выражены антисептическими свойствами в отношении микроорганизмов. Препараты на основе лекарственных растений оказывают щадящие воздействие на организм, обладают сравнительно низкой токсичностью и на них редко наблюдается аллергическая реакция [4].

Поскольку растительные препараты представляют сложную смесь различных метаболитов, очень важно иметь представление о механизме конечного антибактериального воздействия препарата на бактерии. Это позволит не только правильно их применять, но и охарактеризовать антибактериальную компоненту.

На кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова была разработана векторная система двойных реаторёров pDualrep2. Данная плазмида позволяет по включению синтеза флуоресцентных белков у рекомбинантных клеток *Escherichia coli* детектировать *in vivo* нарушение синтеза белка и/или биосинтеза ДНК бактерий [5, 6].

Целью нашего исследования являлось определение механизмов антибактериального действия экстрактов лекарственных растений с использованием данной реаторной системы.

Материал и методы

В качестве объектов исследования были взяты кора, корни, стебли, листья и соцветия лекарственных растений, собранные на территории Республики Башкортостан [7]. В работе использовалось как свежесобранные сырьё, так и высушенные образцы лекарственных растений.

Как известно, активно действующие вещества растений накапливаются в определённую фазу вегетативного периода [8]. Лекарственные растения, представленные в таблице, были собраны с учётом роста и развития растения. В исследовании также использовалось засушенное растительное сырьё в связи с тем, что активные вещества растений в

процессе высушивания могут как модифицироваться, так и разрушаться в результате ферментации, лизиса, обезвоживания и окисления [9].

Экстракцию растений проводили путём приготовления отваров, настоев и заготовкой спиртовых настоек. Для приготовления отвара использовали 4 г измельчённого растительного сырья и 100 мл дистиллированной воды. Отвар кипятили 15 мин на водяной бане, после охлаждали при комнатной температуре (24°C) в течение 20 мин и затем процеживали через марлю. Настой готовили из 4 г растительного сырья, залитого 100 мл кипятка, после настаивали 2 ч при 24°C и процеживали через марлю. Для получения спиртовых настоек, измельчённые лекарственные растения заливали 70% этиловым спиртом в соотношении 1:10, настаивали в тёмном месте в течение 2 нед., затем отфильтровывали [10]. Диски для анализа готовили путём пропитки стерильных кружков фильтровальной бумаги диаметром 5 мм 40 мкл экстракта растений. Диски после пропитки высушивали при комнатной температуре под ламинированным потоком воздуха и сразу использовали для анализа.

Для выявления механизмов антибактериальной активности использовали реаторную систему pDualrep2, представляющую собой штамм *E. coli* BW25113 *dtolC* с нарушенной системой эфмолюка, трансформированный плазмидным вектором pRFP-sulA/Katushka2S-2Ala (рис. 1).

Система состоит из двух компонент: 1) реатора ингибирования биосинтеза ДНК — ген красного флуоресцентного белка RFP (максимум испускания 584 нм) под контролем промотора sulA; 2) реатора ингибирования трансляции — ген флуоресцентного белка Katushka2S (максимум испускания 635 нм) в плюс области от модифицированного триптофанового аттенюатора под контролем строго конститтивного T5-промотора [11].

Экспрессия Katushka2S возрастает в случае, если антибиотик действует на процесс синтеза белка (красный светофильтр), а экспрессия RFP — в случае включения в клетке SOS-ответа (зелёный светофильтр).

Для скрининга готовили чашки Петри с питательной средой Лурия-Бертани (LB) с добавлением ампцицилина. Для проведения посева сплошным газоном, на чашки наносили суспензию из жидкой питательной среды LB и одиночной колонии реаторного штамма с добавлением ампцицилина. Затем на чашки Петри выкладывали заранее приготовленные фильтровальные диски, пропитанные 40 мкл экстрактов растений. Инкубацию образцов осуществляли в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч. Фотодокументирование чашек проводили на приборе ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, США).

Результаты и обсуждение

Механизмы антибактериального действия вторичных метаболитов растений достаточно разнообразны. Многие из них описаны и по характеру воздействия на клетки бактерий подразделяются на механизмы повреждения клеточной стенки и цитоплазматической мембранны бактерий, нарушения энергетического обмена и процессов метаболизма, а также синтеза ДНК [12].

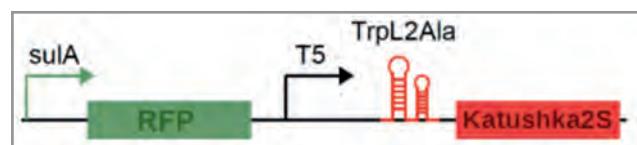


Рис. 1. Репортерная система pDualrep2 [5, 6].
Fig. 1. The reporter system pDualrep2 [5, 6].

В результате экспериментов удалось установить механизмы антибактериального действия отваров, настоев и спиртовых настоек некоторых лекарственных растений. В целом, спиртовые экстракты проявляли большую активность, чем водные. Также выявляются отличия в активности экстрактов, полученных из свежих и высушенных образцов растений. При этом, если в случае водных экстрактов активность выше у свежего сырья, то в случае высушенного материала лучше применять спиртовую экстракцию (таблица).

Анализ антибактериальной активности экстрактов различных частей лекарственных растений
Antibacterial activity analysis of extracts made using various parts of medicinal plants

Название лекарственного растения и его часть	Экстракт свежего растения			Экстракт высушенного растения		
	Настойка	Настой	Отвар	Настойка	Настой	Отвар
1. Почки Березы повислой	+++	—	—	++	—	—
2. Молодые листья Березы повислой	—	—	—	—	—	—
3. Корень Бадана толстолистного	++	K+	K+	+	—	—
4. Соцветия Гравилата городского	—	—	—	—	—	—
5. Листья Гравилата городского	—	—	—	—	—	—
6. Корень Гравилата городского	++	—	—	—	—	—
7. Листья Душицы обыкновенной	—	—	—	—	—	—
8. Соцветие Девясила высокого	—	—	—	+	—	—
9. Листья Девясила высокого	—	—	—	K±	—	—
10. Корень Девясила высокого	+++	++	—	+++++	—	—
11. Листья Дуба обыкновенного	—	—	—	++	—	—
12. Кора Дуба обыкновенного	—	—	—	—	—	—
13. Листья Ежевики сизой	—	—	—	+	—	—
14. Трава Зверобоя обыкновенного	—	—	—	+	—	—
15. Соцветия Клевера лугового	—	—	—	+	—	—
16. Соцветия Кровохлебки лекарственной	K+	—	—	+	—	—
17. Листья Кровохлебки лекарственной	—	—	—	—	—	—
18. Корень Кровохлебки лекарственной	++	—	K+	—	—	—
19. Почки Лиственницы сибирской	++	—	—	±	—	—
20. Хвоя Лиственницы сибирской	—	—	—	—	—	—
21. Цветки Липы сердцевидной	—	—	—	—	—	—
22. Листья Липы сердцевидной	—	—	—	—	—	—
23. Трава Лапчатки гусиной	K±	—	—	—	—	—
24. Листья Мать-и-мачехи	—	—	—	—	—	—
25. Листья Мяты перечной	—	—	—	—	—	—
26. Трава Польни горькой	—	—	—	—	—	—
27. Корень Польни горькой	—	—	—	—	—	—
28. Листья Подорожника большого	—	—	—	—	—	—
29. Почки Сосны обыкновенной	+	—	—	+	—	—
30. Хвоя Сосны обыкновенной	—	—	—	++	—	—
31. Цветки Сирени обыкновенной	—	—	—	—	—	—
32. Листья Сирени обыкновенной	—	—	—	—	—	—
33. Кора Сирени обыкновенной	—	—	—	—	—	—
34. Соцветия Тысячелистника обыкновенного	—	—	—	K+++	+	+
35. Листья Тысячелистника обыкновенного	—	—	—	—	—	—
36. Соцветия Чистеца лесного	—	—	—	—	—	—
37. Листья Чистеца лесного	—	—	—	—	—	—
38. Листья Черёмухи обыкновенной	—	—	—	—	—	—
39. Кора Черёмухи обыкновенной	—	—	—	—	—	—
40. Листья Чистотела большого	—	—	—	3++	—	—
41. Стебель Чистотела большого	3+	—	—	3++	—	—
42. Корень Чистотела большого	3++	—	—	3+++!	3±	—

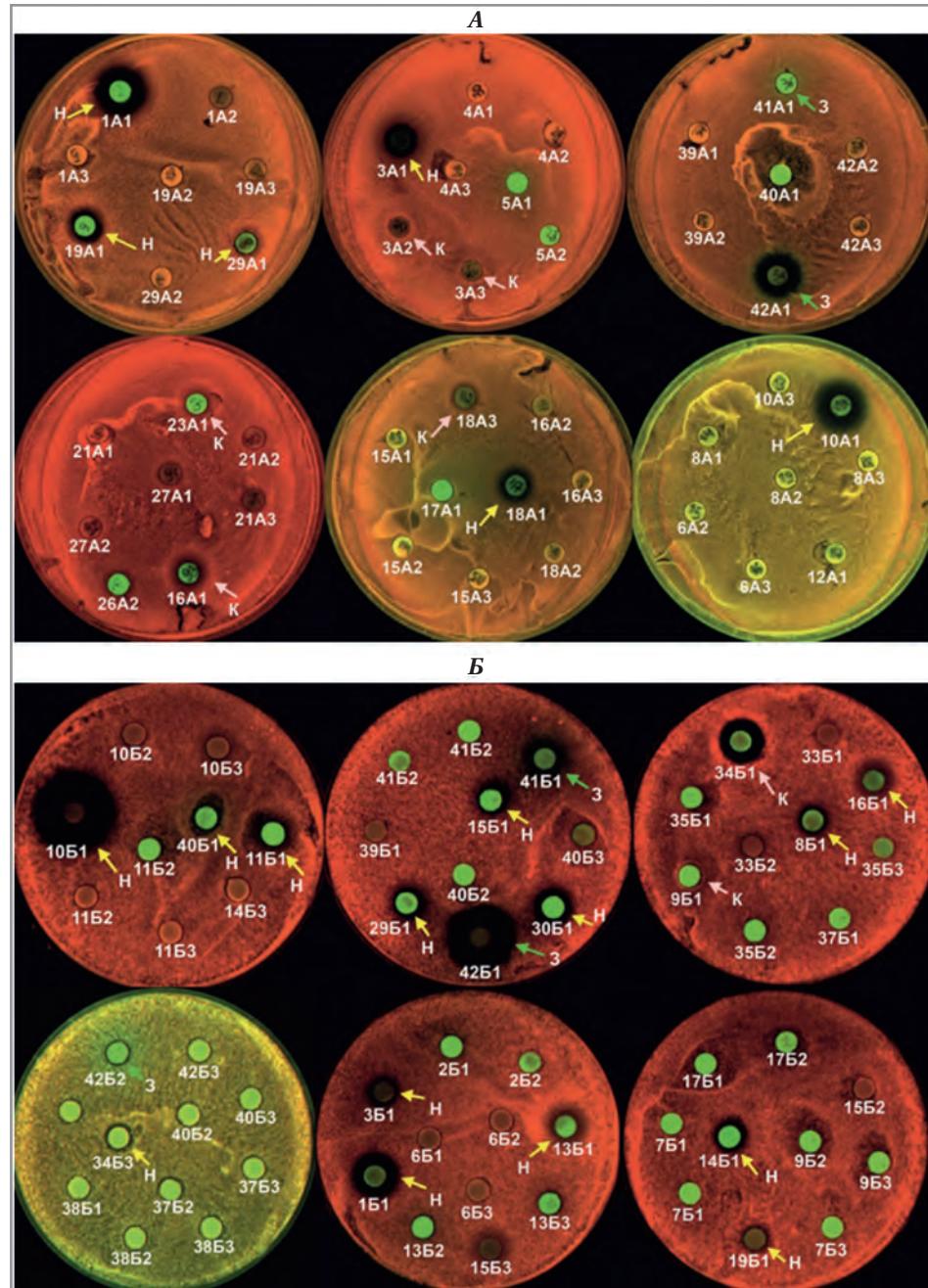
Примечание. «—» — антибактериальный механизм не выявлен; «+» — антибактериальный механизм неясной этиологии; «K+» — подавление синтеза белков; «3+» — включения в клетке SOS-ответа.

Note. «—» — the antibacterial mechanism has not been identified; «+» — antibacterial mechanism of unknown etiology; «K +» — suppression of protein synthesis; «3 +» — activation of the SOS response in the cell.

основном это антибактериальные растительные пептиды, блокирующие функционирование рибосомы, такие как α -hairpin [13]. Подобные посттрансляционно модифицированные бактериальные пептиды — бактериоцины — участвуют в регуляции численности микробных сообществ [14].

Выраженный SOS-ответ клеток бактерий *E. coli* наблюдался при воздействии веществ спиртовой экстракции как сырых, так и высушенных образцов чистотела большого. Причём эффект наблюдался в той или иной степени как в корнях, так и в стеблях и листьях. Вторичные метаболиты растений, способные нарушать метаболизм нуклеиновых кислот, уже описаны. Одни из них действуют на саму ДНК/РНК, другие блокируют работу ферментов нуклеинового обмена. Например, алкалоид берберин способен связываться с ДНК, блокируя её репликацию [15]. Также некоторые флавоноиды (робинетин, мирицетин, эпигаллотецин) способны избирательно блокировать репликацию ДНК [16]. Флаванол кверцетин ингибирует ДНК-гиразу (Торо IIА) в клетках *E. coli*, а камптокетин способен связываться с топоизомеразой IА типа (Торо IА), которые играют важную роль в расплетании ДНК бактерий в процессе её репликации [17, 18].

Выраженными антибактериальными свойствами с неясным механизмом действия обладают спиртовые экстракты сырых и высушенных корней девясила высокого



го, а также почек берёзы повислой. В меньшей степени рост *E.coli* подавляется метаболитами из спиртовой экстракции листьев дуба обыкновенного, почек лиственницы сибирской и хвои сосны обыкновенной. Некоторая активность наблюдается при воздействии спиртовых экстрактов листьев ежевики сизой, зверобоя обыкновенного, соцветий клевера лугового и почек сосны обыкновенной.

Таким образом, в результате проделанной работы были установлены механизмы антибактериального действия некоторых экстрактов лекарственных растений, полученных из свежего и высушенного сырья. Система двойных репортёров Dualrep2 позволяет с высокой эффектив-

ностью детектировать ингибицию синтеза белка и включение SOS-сигнала у бактерий *E.coli* при воздействии метаболитов экстрактов лекарственных растений с антимикробной активностью. Полученные результаты позволяют рассматривать исследуемые экстракты лекарственных растений как основу для получения новых антибактериальных средств с определённым механизмом действия.

Исследование выполнено за счёт гранта Российской научного фонда № 22-24-00193, <https://rscf.ru/project/22-24-00193/>.

Литература/References

1. Тренин А.С. Методология поиска новых антибиотиков: состояние и перспективы. Антибиотики и химиотер. 2015; 60 (7–8): 34–46. [Trenin A.S. Methodology of screening new antibiotics: present status and prospects. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2015; 60 (7–8): 34–46. (in Russian)]
2. Федько И.В., Китапова Р.Р., Муштоватова Л.С. Скрининговое исследование антимикробной активности некоторых растений из флоры Сибири. Медицинский вестник Башкортостана. 2016; 11 (5) (65): 117–119. [Fedko I.V., Kitapova R.R., Mushtovatova L.S. Screening study of antimicrobial activity of some plants from the Siberia flora. Meditsinskii Vestnik Bashkortostana. 2016; 11 (5) (65): 117–119. (in Russian)]
3. Тапалский Д.В., Тапалский Ф.Д. Антибактериальная активность официальных лекарственных растений в отношении экстремально-антибиотико-резистентных грамотрицательных бактерий. Проблемы здоровья и экологии. 2015. 4 (46): 69–74. [Tapalski D.V., Tapalski F.D. The antibacterial activity of officinal herbs in regard to extensively antibiotic-resistant gram-negative rods. Problemy Zdorov'ya i Ekologii. 2015; 4 (46): 69–74. (in Russian)]
4. Самбукова Т.В., Овчинников Б.В., Ганапольский В.П., Ятманов А.Н., Шабанов П.Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2017; 15 (2): 56–63. doi: <https://doi.org/10.17816/RCF15256-63>. [Sambukova T.V., Ovchinnikov B.V., Ganapolskii V.P., Yatmanov A.N., Shabanov P.D. Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology. Obzory po Klinicheskoi Farmakologii i Lekarstvennoi Terapii. 2017; 15 (2): 56–63. doi: <https://doi.org/10.17816/RCF15256-63>. (in Russian)]
5. Терехов С.С., Остреман И.А., Смирнов И.В. Высокопроизводительный скрининг природного биоразнообразия с целью поиска новых антибиотиков. Acta Naturae. 2018; 10 (3) (38): 24–30. [Terekhov S.S., Osterman I.A., Smirnov I.V. Vysokoproizvoditel'nyi skrininng prirodnogo bioraznoobraziya s tsel'yu poiska novykh antibiotikov. Acta Naturae. 2018; 10 (3) (38): 24–30. (in Russian)]
6. Сергиеев П.В., Остреман И.А., Головина А.Я., Андреянова Е.С., Лаптев И.Г., Плетнев Ф.И. и др. Высокопроизводительная платформа для скрининга новых ингибиторов биосинтеза белка. Вестник Московского университета. сер. 2. Химия. 2015; 56 (6): 405–408. [Sergieev P.V., Osterman I.A., Golovina A.Ya., Andreyanova E.S., Laptev I.G., Pletnev P.I. High throughput screening platform for new inhibitors of protein synthesis. Vestnik Moscow University Chemistry Bulletin. 2015; 56 (6): 405–408. (in Russian)]
7. Кьюсов П.А. Лекарственные растения: самый полный справочник. М.: Эксмо; 2011. [Kosev P.A. Lekarstvennye rasteniya: samyi polnyi spravochnik. Moscow: Eksmo, 2011. (in Russian)]
8. Цугленок Г.И., Худоногова Е.Г. Коэффициент выхода активно действующих веществ лекарственных растений. Вестник КрасГАУ. 2006. 11: 213–216. [Tsuglenok G.I., Khudonogova E.G. Koeffitsient vkhoda aktivno deistvuyushchikh veshchestv lekarstvennykh rasteniyakh. Vestnik KrasGAU. 2006; 11: 213–216. (in Russian)]
9. Колдаев В.М., Зориков П.С., Бездетко Г.Н. Физико-химические свойства настоек на свежих и высушенных листьях лекарственных растений. Тихоокеанский медицинский журнал. 2013; 2: 94–96. [Koldaev V.M., Zorikov P.S., Bezdetko G.N. Fiziko-khimicheskie svoistva nastoek na svezhikh i vysushennykh list'yakh lekarstvennykh rastenii. Tikhookeanskiy Meditsinskii Zhurnal. 2013; 2: 94–96. (in Russian)]
10. Ершова И.Б., Осипова Т.Ф. Общие требования к приготовлению настоек, отваров. Дозирование фитопрепаратов. Актуальная инфектология. 2016; 13 (12): 123–127. doi: <https://doi.org/10.22141/2312-413x.3.12.2016.81727>. [Ershova I.B., Osipova T.F. General Requirements to the Preparation of Tinctures, Decoctions. Dosage of Phytopreparations. Actual Infectology. 2016; 13 (12): 123–127. doi: <https://doi.org/10.22141/2312-413x.3.12.2016.81727>. (in Russian)]
11. Остреман И.А. Поиск и изучение новых антибиотиков ингибиторов синтеза белка: Дисс. док. хим. наук. М.: 2018. [Osterman I.A. Poisk i izuchenie novykh antibiotikov ingibitorov sinteza belka. [dissertation] Moscow: 2018. (in Russian)]
12. Буданова Е.В., Горленко К.Л., Киселев Г.Ю. Вторичные метаболиты растений: механизмы антибактериального действия и перспективы применения в фармакологии. Антибиотики и химиотер. 2019; 64 (5–6): 69–76. doi: <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-100034>. [Budanova E.V., Gorlenko K.L., Kiselev G.Yu. Secondary plant metabolites: mechanisms of antibacterial action and perspectives of application in pharmacology. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2019; 64 (5–6): 69–76. doi: <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-100034>. (in Russian)]
13. Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A. Defense Peptides From the α -Hairpinin Family Are Components of Plant Innate Immunity. Front Plant Sci. 2020; 11: 465. doi: 10.3389/fpls.2020.00465.
14. Travin D.Y., Watson Z.L., Metelev M., Ward E.R., Osterman I.A., Khven I.M., Khabibullina N.F., Serebryakova M., Mergaert P., Polikanov Y.S., Cate J.H.D., Severinov K. Structure of ribosome-bound azole-modified peptide phazolicin rationalizes its species-specific mode of bacterial translation inhibition. Nat Commun. 2019; 10: 4563. doi: 10.1038/s41467-019-12589-5.
15. Roger T., Pierre-Marie M., Igor V., Patrick V. Phytochemical screening and antibacterial activity of medicinal plants used to treat typhoid fever in Bambarous division, West Cameroon. J Appl Pharm Sci. 2015; 5 (06): 034–049.
16. Zhang Y.-M., Rock C.O. Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. J Biol Chem. 2004; 279: 30994–31001. doi: 10.1074/jbc.M403697200.
17. Paiva P.M.G., Gomes E.S., Napoleão Th. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol. 2010; 396–406.
18. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer. 2006; 6: 789–802. doi: 10.1038/nrc1977.

Информация об авторах

Баймиеев Алексей Ханифович — д. б. н., заведующий лабораторией биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН, профессор кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Уфа, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0606-6740. ResearcherID: R-8393-2016.

Чуваткина Анна Кирилловна — студент ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Уфа, Россия

Владимирова Анастасия Андреевна — м. н. с. лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН, Уфа, Россия

Матниязов Рустам Тахирович — к. б. н., н. с. лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН, Уфа, Россия

Мавзютов Айрат Радикович — д. м. н., проф., заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Уфа, Россия

Баймиеев Андрей Ханифович — д. б. н., в. н. с. лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН, профессор кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Уфа, Россия

About the authors

Alexey Kh. Baymiev — D. Sc. in Biology, Head of the Laboratory of Bioengineering of Plants and Microorganisms at the Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences; Professor at the Department of Fundamental and Applied Microbiology of the Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0606-6740. ResearcherID: R-8393-2016.

Anna K. Chuvatkina — Student at the Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

Anastasia A. Vladimirova — Junior researcher at the Laboratory of Bioengineering of Plants and Microorganisms, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

Rustam T. Matniyazov — Ph. D. in Biology, Researcher at the Laboratory of Bioengineering of Plants and Microorganisms, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

Ayrat R. Mavzyutov — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Fundamental and Applied Microbiology, Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

Andrey H. Baymiev — D. Sc. in Biology, Leading Researcher at the Laboratory of Bioengineering of Plants and Microorganisms, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences; Professor at the Department of Fundamental and Applied Microbiology, Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

Анализ плазмид комплекса *Klebsiella pneumoniae*, несущих кластер генов синтеза аэробактина, представленных в международных базах данных

В. В. ШАПОВАЛОВА¹, П. С. ЧУЛКОВА², *В. А. АГЕЕВЕЦ²

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» (ФГБУ «ЦСП») ФМБА России, Москва, Россия

² ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» (ФГБУ «ДНКЦИБ») ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Analysis of Plasmids of the *Klebsiella pneumoniae* Complex Carrying a Cluster of Aerobactin Synthesis Genes as Presented in International Databases

VLERİYA V. SHAPOVALOVA¹, POLINA S. CHULKHOVA², *VLADIMIR A. AGEEVETS²

¹ Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

Резюме

Введение. На данный момент принято выделять два патотипа *Klebsiella pneumoniae* — классические и гипервирулентные, обладающие способностью вызывать внебольничные инфекции у здоровых людей. Показано, что увеличение вирулентности связано с приобретением дополнительного генетического материала — плазмиды, несущий кластер генов аэробактина. **Цель.** Оценить распространённость данных вирулентных плазмид в мире и в России и выявить ключевые генетические особенности. **Материал и методы.** Последовательности плазмид были выгружены из баз данных PLSDB и BV-BRC, аннотированы программами Abricate и Kleborate, кластерный анализ проведен программой mge-cluster, филогенетический анализ программой Parsnp. **Результаты.** Было проанализировано 296 последовательностей плазмид, выделенных из 23 стран из клинических изолятов *K. pneumoniae* в период с 2006 г. по 2021 г. с пиковым значением в 2019 г., более половины плазмид — из Китая. Было идентифицировано более 30 сиквенс типов, среди которых преобладали ST11 и ST23. Гены репликонов группы IncFIB были выявлены почти во всех исследуемых плазмидах. Преобладающим типом аэробактина в исследуемых последовательностях был первый, также были выявлены последовательности с *iuc3* и *iuc5*. Гены синтеза сальмохелина были выявлены только в 37,1% последовательностей, кластер йерсиниабактина был идентифицирован на двух плазмидах из Китая, 32,1% плазмид несли гены устойчивости, из которых 7,4% — гены беталактамаз расширенного спектра и в 5% были выявлены гены карбапенемаз. Было получено 9 кластеров последовательностей, почти все плазмиды из России были отнесены к одному кластеру и были NDM-позитивными. Вместе с плазмидами из других европейских стран (Великобритания, Норвегия, Чехия) они образовали отдельную ветку на филогенетическом дереве. **Заключение.** Вирулентные плазмиды, несущие кластер генов синтеза аэробактина, имеют глобальное распространение, почти треть из них несут также гены устойчивости к антибиотикам.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; гипервирулентность; плазмиды; множественная резистентность; эпидемиология

Для цитирования: Шаповалова В. В., Чулкова П. С., Агеецев В. А. Анализ плазмид комплекса *Klebsiella pneumoniae*, несущих кластер генов синтеза аэробактина, представленных в международных базах данных. Антибиотики и химиотерапия. 2023; 68: 7–8: 17–26. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-17-26>.

Abstract

Background. Currently, it is customary to distinguish two pathotypes of *Klebsiella pneumoniae* — classical and hypervirulent, which have the ability to cause community-acquired infections in healthy people. It has been shown that an increase in virulence is associated with the acquisition of additional genetic material — a plasmid carrying a cluster of aerobactin genes. **Aim.** To assess the prevalence of the aforementioned virulent plasmids around the globe and in Russia in particular, as well as to identify their key genetic features. **Materials and methods.** Plasmid sequences were downloaded from PLSDB and BV-BRC databases, annotated with the Abricate and Kleborate programs; cluster analysis was performed using the mge-cluster program, and phylogenetic analysis was performed using the Parsnp program. **Results.** 296 plasmid sequences isolated from 23 countries from clinical isolates of *K. pneumoniae* between 2006 and 2021 with a peak in 2019 were analyzed, with more than half of the plasmids coming from China. More than 30 sequence types were identified, among which ST11 and ST23 were predominant. Replicon genes of the IncFIB group were identified in almost all plasmids studied. The pre-

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Профессора Попова, д. 9, ФГБУ «ДНКЦИБ», Санкт-Петербург, Россия, 197022. E-mail: ageevets@list.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 9 Professora Popova str., Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, 197022 Russia. E-mail: ageevets@list.ru

dominant type of aerobactin in the studied sequences was the first type (*iuc1*); sequences with *iuc3* and *iuc5* were also identified. Salmochelin synthesis genes were identified in only 37.1% of sequences; the yersiniabactin cluster was identified in two plasmids from China. 32.1% of plasmids carried resistance genes, of which 7.4% carried extended-spectrum beta-lactase genes and 5% contained carbapenemase genes. Nine clusters of sequences were obtained; almost all plasmids from Russia were assigned to one cluster and were NDM-positive. Together with plasmids from other European countries (Great Britain, Norway, Czech Republic), they formed a separate branch on the phylogenetic tree. Conclusion. Virulent plasmids carrying the aerobactin synthesis gene cluster are distributed globally, and almost a third of them also carry antibiotic resistance genes.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; hypervirulence; plasmids; multidrug resistance; epidemiology.

For citation: Shapovalova V. V., Chulkova P. S., Ageevets V. A. Analysis of plasmids of the *Klebsiella pneumoniae* complex carrying a cluster of aerobactin synthesis genes as presented in international databases. *Antibiotiki i Khimioter* = Antibiotics and Chemotherapy. 2023; 68: 7–8: 17–26. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-17-26>.

Введение

По расчётым данным *Klebsiella pneumoniae* занимает 4-е место среди причин смерти от инфекционных болезней, так в 2019 г. в мире этот патоген вызвал около 800 000 летальных исходов [1]. В течение многих лет значение клебсиелл в патологии человека определялось, в основном, их ролью в этиологии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи преимущественно у пациентов с коморбидностью [2]. Лечение этих инфекций осложнялось высокой частотой множественной антимикробной резистентности, в том числе и к карбапенемам, вызванной распространением карбапенемаз [3]. Среди множества известных карбапенемаз глобальное распространение и, соответственно, значение получили плазмидные ферменты KPC-, NDM-, OXA-48-типов [4]. В Российской Федерации доминируют карбапенемазы NDM-OXA-48-типов [5–7]. Благоприятным фактором, ограничивающим бремя клебсиеллёзных инфекций, можно считать то, что большинство клебсиелл — возбудителей нозокомиальных инфекций различной локализации, при высокой частоте множественной устойчивости характеризуются невысокой вирулентностью.

Однако в 1986 г. в Тихоокеанском регионе у условно-здоровых людей были описаны случаи тяжёлых внебольничных инфекций со специфической клинической картиной (абсцессы печени и другой локализации, эндофталмиты), вызванных *K. pneumoniae* [8]. В последующем такие инфекции начали описывать и в других регионах [9–11]. Высокая вирулентность таких клебсиелл была подтверждена экспериментально, при сепсисе мышей их полулетальная доза составила 10^2 КОЕ, в то время как для доминирующих клебсиелл это значение 10^6 КОЕ и более [12]. Полностью причины повышенной вирулентности в настоящее время не определены. Повышенную вирулентность проявляют клебсиеллы серотипов K1, K2 и некоторых других [12, 13]. Также достаточно убедительно доказана роль ряда плазмидных генов, включая гены, ответственные за биосинтез и транспорт сидерофоров

аэробактина (*iucABCD* и *iutA*) и салмохелина (*iro*), а также регуляторов экспрессии капсульного полисахарида (*rmpA* и *rmpA2*) и транспортёра *peg-344* с неизвестной функцией [14–17]. Эти гены локализованы на плазмidaх типа pLVPK (224 152 п. н.) [18] и pK2044 (219 385 п. н.) [19].

Клебсиеллы, обладающие низким уровнем вирулентности, принято обозначать как классический патотип (*classical Klebsiella pneumoniae* — cKp), представители этого патотипа могут проявлять множественную антимикробную резистентность [2, 20]. Клебсиеллы, обладающие высокой вирулентностью, обозначают как гипервирулентный патотип (*hypervirulent Klebsiella pneumoniae* — hvKp), представители этого патотипа, как правило, сохраняют чувствительность к антимикробным препаратам. Долгое время считалось, что эти патотипы существуют относительно независимо.

Тем не менее в 2018 г. во время вспышки нозокомиальных инфекций были обнаружены гипервирулентные клебсиеллы, обладавшие также множественной антимикробной резистентностью благодаря продукции карбапенемазы KPC-типа [21]. Таким образом, произошла конвергенция свойств множественной резистентности и гипервирулентности, а новый вариант клебсиелл стали относить к конвергентному патотипу [2]. Клебсиеллы этого патотипа чаще всего обозначают как CRhvKp (*carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae*). После первого описания CRhvKp в Китае, этот патотип стал необычайно быстро распространяться в других географических регионах [22], в том числе и в России [23–26].

Формирование конвергентного патотипа может быть результатом приобретения изолятом, несущим плазмиды либо резистентности, либо вирулентности дополнительной плазмиды с другими свойствами. Тот факт, что обнаружить конвергентные изоляты долгое время не удавалось объясняют отсутствием у крупных плазмид вирулентности (pLVPK и сходных) генетического аппарата, обеспечивающего конъюгативный перенос. Теоретически появление клебсиелл, ко-

торые одновременно сочетали бы множественную резистентность с гипервирулентностью также считалось маловероятным событием из-за большого генетического груза приобретённых генов, определяющих оба свойства, что должно было негативно повлиять на адаптивность. Однако в настоящее время показано, что мобилизация крупных плазмид вирулентности возможна, это происходит в результате достаточно сложных и редких генетических событий [27], частота которых по непонятным причинам в последнее время, судя по всему, возрастает. Более того, есть основания полагать, что мобилизация генов вирулентности и их импорт в сКр происходит чаще, чем импорт генов резистентности в hvKр изоляты [28]. Возможно, это связано с тем, что увеличенная капсула hvKр изолятов препятствует эффективной коньюгации. Относительно недавно стало понятным, что возникновение конвергентного патотипа может быть результатом формирование крупных (гибридных) плазмид, несущих одновременно гены устойчивости к карбапенемам и гены гипервирулентности [25, 26, 29–32]. В состав таких плазмид обычно входит относительно постоянный набор генов вирулентности, свойственный каноническим плазмидам pLVPK и pK2044, а также гены различных карбапенемаз. Механизм формирования гибридных плазмид детально не изучен.

Очевидно, что формирование и распространение среди клебсиелл вирулентности и антимикробной резистентности определяется двумя процессами: горизонтальным переносом генов в составе подвижных генетических элементов и распространением генетических линий. В недавней работе было проанализировано около 13 000 публично доступных геномов *K. pneumoniae* с точки зрения распространения репликонов плазмид, а также генов резистентности и вирулентности [28]. Авторам удалось выделить девять кластеров репликонов плазмид из CRKр, hvKр и CRhvKр изолятов, оценить их географическое распространение, связь с сиквенс-типами и наличием генов вирулентности и резистентности.

В данной работе проведён анализ всех доступных в международных базах данных последовательностей плазмид, с помощью нескольких биоинформатических подходов с целью описания сформировавшегося разнообразия генетических платформ, которые несут кластер биосинтеза аэробактина iuc, как наиболее значимого маркера гипервирулентности, изучена глобальная популяция, а также выявлены генетические особенности плазмид, обнаруженных ранее на территории Российской Федерации.

Материал и методы

Уникальные последовательности плазмид с геном *iucA* были выгружены из баз данных PLSDB v.2021_06_23_v2 [33] и BV-BRC 3.30.5 [34] по состоянию на 01.11.2022. Была проведена фильтрация хромосомных и неполных плазмидных последовательностей. Были включены последовательности только из изолятов комплекса *Klebsiella* spp. Репликоны плазмид вирулентности, факторы вирулентности и гены устойчивости к антибиотикам были идентифицированы с помощью Abricate [35] и Kleborate [36] с базами данных PlasmidFinder [37], BIGSDB [38], Resfinder [39], используя минимальное покрытие 60% и минимальную идентичность 90%. Кластерный анализ был выполнен с помощью инструмента tge-cluster [40]. Филогенетический анализ проведён с помощью программы Parsnp [41], иллюстрация дерева выполнена с использованием программы iTol [42]. Типирование генома было проведено по схеме MLST [38,43].

Результаты

Общая характеристика плазмид. В анализ было включено 296 последовательностей плазмид различных длин (70586–479335 п.н.; медиана, 218036 п. н.) из 23 стран (рис. 1, *a*).

Более половины (53%) проанализированных плазмид были выделены в Китае. В Южной Корее, Индии и России выделено по 10–20 плазмид, страна выделения для 33 плазмид не известна. Большинство плазмид было выделено в период с 2006 г. по 2021 г. с пиковым значением в 2019 г. (рис. 1, *b*). По одной плазмиде выделено в 1911 и 1950/1955 гг., что вероятно, обусловлено анализом исторических коллекций. 76,4% исследуемых плазмид были обнаружены у клинических изолятов, 5,4% — от объектов животноводства и диких животных (корова, индейка, кролик, свинья, олень, дикий як), 1,68% последовательностей получены из образцов окружающей среды. У 16,6% не был указан источник выделения.

Почти все плазмиды были выделены из *K. pneumoniae*, за исключением двух плазмид из *Klebsiella quasipneumoniae* (CP031258, NZ_CP066174.1), двух плазмид — из *Klebsiella varicola* (CP032356, NZ_CP027063.3) и одной плазмиды — из *Klebsiella aerogenes* (NZ_LR134257.1, дата выделения 1950 г.), *Klebsiella ozaenae* (CP073286.1), *Klebsiella* sp. P1927 (CP073378). Было идентифицировано более 30 сиквенс типов, среди которых преобладали ST11 и ST23, относящиеся к «азиатским».

Кластеры плазмид. Была выполнена кластеризация плазмидных последовательностей и в общей сложности было получено девять кластеров (рис. 2, таблица).

Кластер 8 оказался самым значительным, в него вошло 50 плазмид, выделенных из *K. pneumoniae* (доминирующим сиквенс типом был ST23), *K. aerogenes* и *K. ozaenae*, в период с 2006 по 2021 г., а также одна плазмода из исторической коллекции 1950 г. Плазмиды были выделены в восьми странах. В Азиатском регионе было вы-

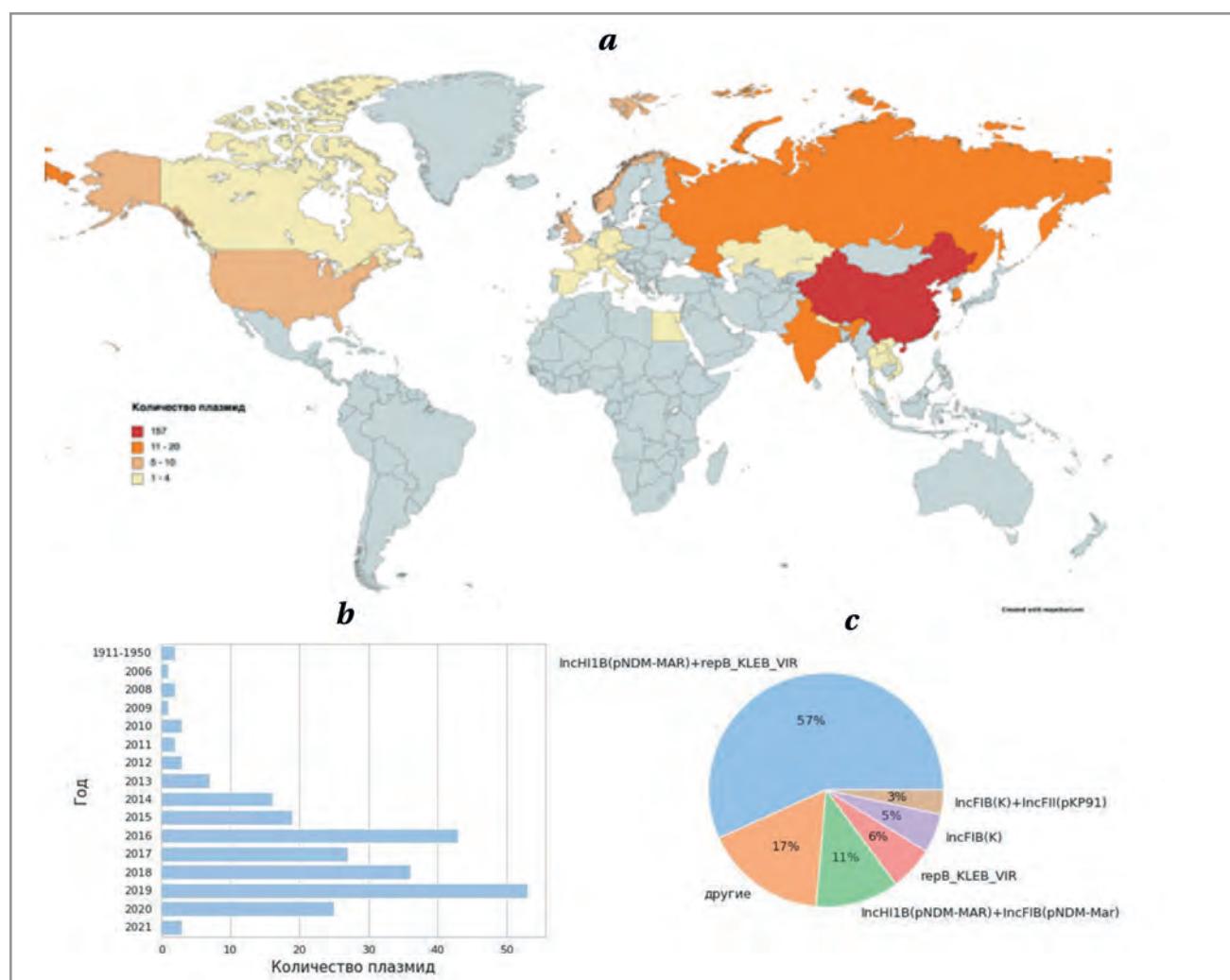


Рис. 1. Характеристика плазмид, включённых в исследование.

а — распределение плазмид по странам выделения; *б* — распределение плазмид по годам выделения; *в* — типы выявленных репликонов.

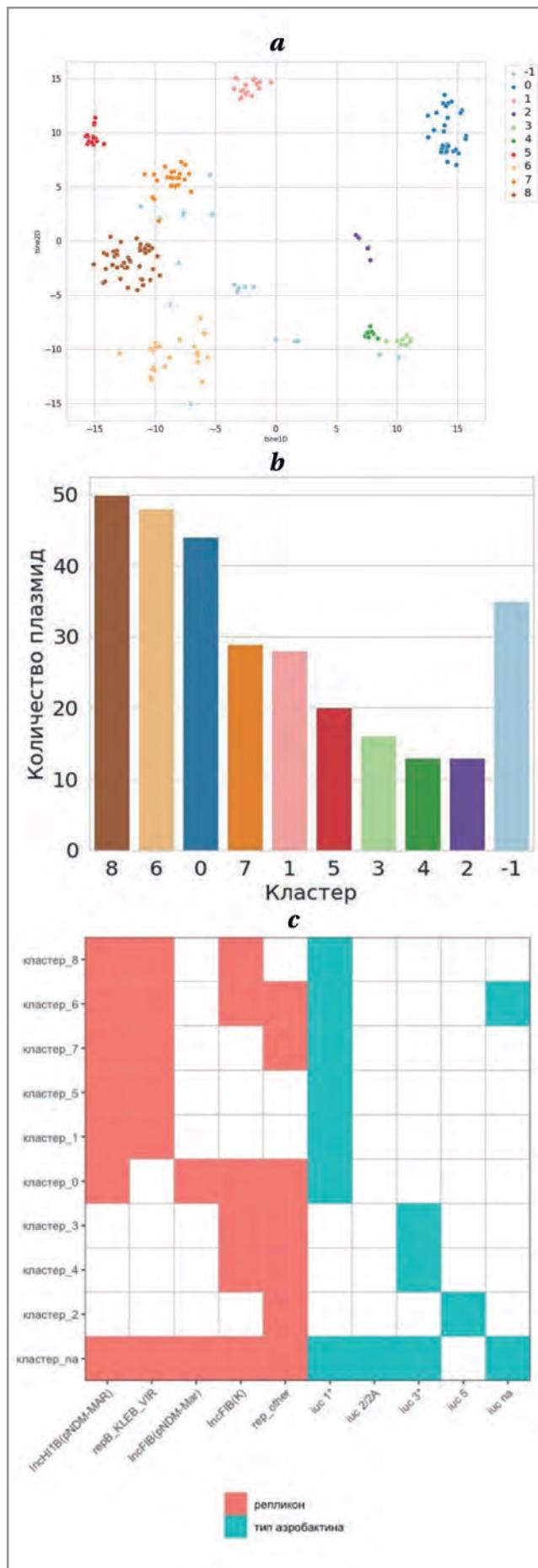
Fig. 1. Characteristics of plasmids included in the study.

а — distribution of plasmids by country of isolation; *б* — distribution of plasmids by year of isolation; *в* — types of identified replicons.

делено 37 (74%) плазмид (Китай (46%), Южная Корея (24%), Тайвань (4%), Казахстан (2%), Сингапур (2%)), в Европе — две (4%) плазмиды (Франция и Россия) и две (4%) плазмиды были выделены в Северной Америке. В России (г. Москва) была выделена одна плазмида. Большинство плазмид (медиана длин ~229 тыс. п. н.) несли два репликона *IncHI1B(pNDM-MAR)* и *repB_KLEB_VIR*. Кластер аэробактина типа 1 (*iuc* 1) был выявлен во всех последовательностях данной группы. Все плазмиды, кроме одной, кодировали полный кластер генов синтеза сальмохеллина (*iro* 1), который был отнесен к первому типу, и одна последовательность кодировала неизвестный тип. Гены регулятора капсулного полисахарида *rmpADC* были идентифицированы в большинстве плазмид и относились к первому типу, ген *rmpA2* — во всех плазмидах, *peg-344* — в 56% исследуемых

последовательностях. На трёх плазмидах были выявлены четыре гена резистентности: *aph(7')*-*Ia*, *dfrA14*, *blaCTX-M-122* и ген карбапенемазы *blaKPC-2*.

В кластер 6 вошли 48 плазмид, выделенных с 2008 г. по 2020 г. (один образец выделен из исторической коллекции 1911 года) в 11 странах. Пять стран относились к Азиатскому региону (Китай, Тайвань, Сингапур, Южная Корея, Гонконг), четыре — к Европе (Германия, Франция, Великобритания, Норвегия), две — к Северной Америке (США, Канада). Как и в предыдущем кластере, большинство плазмид были выделены в Азиатском регионе — 73% (48% — Китай), в Европе — 12%, в Северной Америке — 6%. Практически все плазмиды были выделены у *K. pneumoniae*, только две — у *K. quasipneumoniae*. На всех плазмидах данного кластера, кроме одной, был выявлен ре-



пликон *repB_KLEB_VIR*, 65% плазмид дополнительно несли репликон *IncH1B(pNDM-MAR)* и на двух плазмидах был выявлен репликон *IncFIB(K)(pCAV1099-114)*. Большинство плазмид данного кластера (медиана длин ~211 тыс. п. н.), как и кластера 8, несли гены кластеров аэробактина, сальмохеллина и *rmpADC* первого типа. Ген *rmpA2* был найден также во всех последовательностях, *peg-344* — в 42% исследуемых последовательностях. На двух плазмидах было выявлено 11 генов: *aadA2*, *ant(3")-Ia*, *cmlA1*, *qacE*, *sul1*, *ARR-3*, *aac(6')-Ib-cr*, *aadA16*, *dfrA27*, *floR*, *sul3*.

Кластеру 0 относилось 44 плазмиды, выделенных из *K.pneumoniae* и одна плазмида из *Klebsiella* sp. в период с 2013 по 2019 гг. в 11 странах. Четыре страны относились к Азиатскому региону (Китай, Индия, Южная Корея, Тайвань), пять — к Европейскому (Европейская часть России, Великобритания, Норвегия, Италия, Чехия), одна — к Северной Америке (Канада), одна — к Ближнему Востоку (Египет), в которых относились к Азиатскому региону 50% (39% — из Китая), к Европе — 39% (23% — из Европейской части России) плазмид. Большинство плазмид (медиана длин ~306 тыс. п. н.) кодировали два репликона *IncH1B(pNDM-MAR)* и *IncFIB(pNDM-Mar)*, также были идентифицированы репликоны *IncR* и *IncFIB(K)*. Большинство плазмид данного кластера несли гены кластера аэробактина первого типа, но гены синтеза сальмохеллина кодировала только одна. Ген *rmpA2* был найден во всех плазмидах, *peg-344* — в 20% исследуемых последовательностях. Отличительной особенностью плазмид данного кластера являлась распространённость генов резистентности, кото-

Рис. 2. Кластеризация последовательностей плазмид. а — полученная матрица расстояний, определённых программой mge-cluster. Каждая точка соответствует последовательности плазмиды, и назначенный им кластер помечен цветом, который основан на идентификаторе кластера ($n=9$). Неназначенные последовательности (-1) соответствуют плазмидам с нулевой вероятностью принадлежности к какому-либо определенному кластеру. б — количество плазмид в кластерах. в — распределение репликонов в зависимости в различных кластерах. «на» и «-1» обозначены последовательности, которые не были отнесены к какому-либо кластеру. *iuc 1** и *iuc 3** включают неполное совпадение с данным типом аэробактина.

Fig. 2. Clustering of plasmid sequences.

а — The resulting distance matrix determined by the mge-cluster program. Each dot corresponds to a plasmid sequence and its assigned cluster is labeled with a color that is based on the cluster ID ($N=9$). Unassigned sequences (-1) correspond to plasmids with zero probability of belonging to any particular cluster. б — Number of plasmids in clusters. в — Distribution of replicons depending on different clusters. «на» and «-1» indicate sequences that were not assigned to any cluster. *iuc 1** and *iuc 3** include partial matches to this aerobactin type.

Характеристика полученных кластеров
Characteristics of the resulting clusters

Кластер	Количество	Период выделения	Страны	Ведущие ST	Размер (медиана), тыс. по	Ведущие репликоны	Сидерофоры	Карбапенемазы
8	50	2006–2021	Азия 74% (Китай, Южная Корея, Тайвань, Казахстан, Сингапур) Европа 4% (Россия, Франция) Северная Америка 4% (США)	23	229	IncH1B(pNDM-MAR) repB_KLEB_VIR.	iuc1 (100%) iro1/unknown (98%)	KPC-2 (2%)
6	48	2008–2020	Азия 73% (Китай, Тайвань, Сингапур, Южная Корея, Гонконг) Европа 12% (Германия, Франция, Великобритания, Норвегия) Северная Америка 6% (США, Канада)	—	211	IncH1B(pNDM-MAR) repB_KLEB_VIR.	iuc1 (100%) iro1 (92%)	—
0	44	2013–2019	Азия 50% (Китай, Индия, Южная Корея, Тайвань) Европа 39% (Россия, Великобритания, Норвегия, Италия, Чехия) Ближний Восток (Египет) Северная Америка 2% (Канада)	—	306	IncH1B(pNDM-MAR), IncFIB(pNDM-Mar Incr IncFIB(K).	iuc1 (100%) iro1 (2%)	NDM-тип (30%) OXA-48 (2%)
7	29	2015–2020	Азия 72% (Китая, Южная Корея) Европа 3% (Испания)	—	219	IncH1B(pNDM-MAR), repB_KLEB_VIR, IncFII(pHN7A8), IncR	iuc1 (100%) iro1 (7%)	KPC-2 (7%)
1	28	2016–2021	Азия 100% (Китая)	11	195	IncH1B(pNDM-MAR), repB_KLEB_VIR	iuc1 (100%)	—
5	20	2016–2017	Неизвестно 65% Азия 35% (Китай, Южная Корея)	—	178	IncH1B(pNDM-MAR), repB_KLEB_VIR	iuc1 (100%)	—
3	16	2010–2019	Азия 81% (Китай, Лаос, Таиланд) Европа 19% (Великобритания, Норвегия)	896	181	IncFIB(K), IncFII(pKP91), IncQ1	iuc3(100%)	—
2	13	2016–2020	Азия 69% (Индия, Китай) Европа 15% (Норвегия, Швейцария) Северная Америка 8% (США)	231	73	IncFIA, IncFII(pAM1167-NDM-5), IncFIB(pQil)	iuc5 (100%) iro5 (15%)	—
4	13	2010–2020	Азия 100% (Китай, Вьетнам)	243	IncFIB(K), IncQ1, IncFII(pHN7A8)	iuc3(100%)	—	—

рые были выявлены у 86% исследуемых плазмид, при этом гены карбапенемаз (*blaNDM-1*, *blaNDM-5*, *blaOXA-48*) были выявлены у 32% плазмид.

Десять из 11 плазмид, выделенных в России, были отнесены к кластеру 0, и с этим кластером был проведён дополнительный филогенетический анализ (рис. 3). Все плазмиды были выделены из изолятов от пациентов. Последовательности были разделены на две ветви: ветка I включала только 2 плазмиды из Китая и Тайваня, ветка II состояла из двух субкладов IIa и IIb. Субклад IIa был образован четырьмя плазмидами из Индии, IIb также может быть разделён на два субклада (IIb-1 и IIb-2). Плазмиды из Китая сформировали субклад IIb-1, тогда как большинство плазмид из субклада IIb-2 (ветка выделена красным) были NDM-позитивными и происходили из Европы (Россия, Великобритания, Норвегия, Чехия).

Плазмиды из кластера 7 ($n=29$) были выделены с 2015 по 2020 гг. в трёх странах из *K. pneumoniae*

(доминирующий сиквенс тип ST11): Китай (69%) и по одной плазмиде из Южной Кореи и Испании. На последовательностях (медиана длины ~219 тыс. п. н.) данной группы плазмид выявлены мультирепликон *IncH1B(pNDM-MAR)/repB_KLEB_VIR* и дополнительно на одной плазмиде были найдены репликоны *IncFII(pHN7A8)* и *IncR*. Все плазмиды данного кластера кодировали аэробактин первого типа и только на двух последовательностях выявлен неполный кластер генов сальмохеллина (*iro 1*). Большинство плазмид несли гены *rmpADC* первого типа и во всех плазмидах выявлен ген *rmpA2*, *peg-344* — в 31% исследуемых последовательностей. 4 плазмиды несли различные гены резистентности ($n=12$), включая две плазмиды с геном карбапенемазы *blaKPC-2*.

Плазмиды из кластера 1 ($n=28$) были выделены с 2016 по 2021 гг. в Китае из *K. pneumoniae* (доминирующий сиквенс тип ST11). Все плазмиды

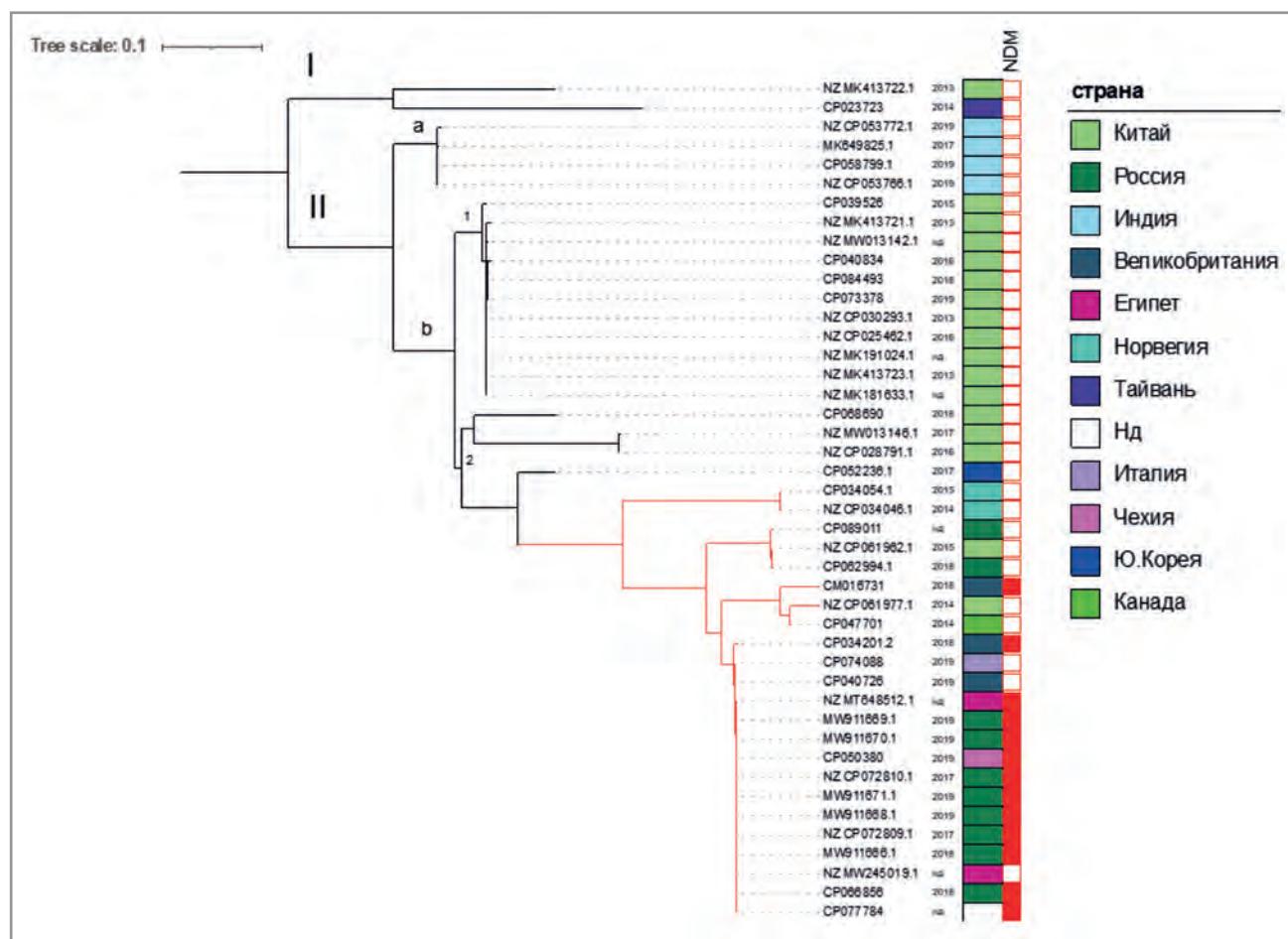


Рис. 3. Филогенетический анализ плазмид из кластера 0.

Примечание. Референс — последовательность MW911666.1. Нд — нет данных. Закрашенный красный квадрат означает наличие гена *blaNDM* на последовательности.

Fig. 3. Phylogenetic analysis of plasmids from cluster 0.

Note. Reference sequence MW911666.1. Нд — no data. A filled red square indicates the presence of the *blaNDM* gene on the sequence.

(медиана длин ~195 тыс. п. н.) данного кластера кодировали мультирепликон *IncH1B(pNDM-MAR)/repB_KLEB_VIR* и аэробактин первого типа. Гены синтеза сальмохеллина не были выявлены. Большинство плазмид несли гены *rmpADC* первого типа и во всех плазмидах выявлен ген *rmpA2*, *peg-344* — в 11%. Гены резистентности не были выявлены.

Для большинства плазмид из кластера 5 ($n=20$) страна и год выделения не известны, кроме плазмид из Китая и Южной Кореи, выделенных в 2016–2017 гг. Все плазмиды были выделены из *K. pneumoniae* с медианой длин ~178 тыс. п. н. и несли кластер аэробактина *iuc* 1 и ген *rmpA2*. Генов *iro*, *rmpADC* и *peg-344* и генов резистентности не было выявлено.

Плазмиды из кластера 3 ($n=16$, медиана длин ~181 тыс. п. н.) были выделены с 2010 по 2019 гг. в пяти различных странах из *K. pneumoniae* (50% — ST896). В Азиатском регионе выделены 81% плазмид (Китай (50%), Лаос (19%), Таиланд (13%)), в Европе — 19% (Великобритания (13%), Норвегия (6%)). Все плазмиды данного кластера, кроме одной, несли два репликона *IncFIB(K)* и *IncFII(pKP91)*, на половине плазмид ещё был выявлен третий репликон *IncQ1*. В отличии от других кластеров, на плазмидах данной группы был найден аэробактин третьего типа. Дополнительные факторы вирулентности *rmpADC*, *rmpA2* и *peg-344* не были выявлены. 75% плазмид несли ещё различные гены резистентности ($n=18$).

Плазмиды из кластера 2 ($n=13$) были выделены из пяти стран, девять (69%) из которых из Азиатского региона (Индия (54%), Китай (15%)), две (15%) из Европы (Норвегия, Швейцария) и одна плазмида из Северной Америки (США) из *K. pneumoniae* (9 плазмид — из штаммов сиквенс типа ST231), отличались сравнительно небольшой медианой длин ~73 тыс. п. н. Более половины плазмид ($n=9$) несли два репликона *IncFIA* и *IncFII(pAMA1167-NDM-5)*, на одной плазмиде был выявлен ещё дополнительно ген репликона *IncFIB(pQil)*. Кластер генов аэробактина был отнесен к пятому типу (*iuc* 5) и две плазмиды кодировали сальмохеллин также пятого типа. Дополнительные факторы вирулентности *rmpADC*, *rmpA2* и *peg-344* не были выявлены. На всех плазмидах данного кластера были выявлены гены резистентности ($n=26$).

Все плазмиды из кластера 4 ($n=13$, медиана длин ~243 тыс. п. н.) были выделены в Азиатском регионе (все, кроме одной плазмиды (Вьетнам) выделены в Китае) из *Klebsiella pneumoniae*. На всех последовательностях был выявлен ген репликона *IncFIB(K)*, в четырёх последовательностях был ещё дополнительно ген репликона *IncQ1* и на одной плазмиде второй репликон был *IncFII(pHN7A8)*. Кластер аэробактина был отнесен к

третьему типу. Дополнительные факторы вирулентности *iro*, *rmpADC*, *rmpA2* и *peg-344* не были выявлены. 70% плазмид несли ещё различные гены резистентности ($n=24$).

Доминирующими репликонами в кластерах 8, 6, 7, 5, 1 были *IncH1B(pNDM-MAR)* и *repB_KLEB_VIR*, в то время как *IncH1B(pNDM-MAR)* и *IncFIB(pNDM-Mar)* были наиболее распространёнными в кластере 0 (рис. 2, с). Репликон *IncFIB(K)* был наиболее распространён в кластерах 3 и 4, репликоны *IncFIA* и *IncFII* — в кластере 2. Доминирующим типом аэробактина был *iuc* 1, и он был обнаружен во всех кластерах, кроме 3, 4 и 2. *iuc* 3 был идентифицирован в кластерах 3 и 4, тогда как *iuc* 5 обнаружен только в кластере 2.

Обсуждение

Гибридные плазмиды, содержащие одновременно гены вирулентности и антимикробной резистентности (прежде всего гены карбапенемаз), представляют серьёзную угрозу всей системе здравоохранения из-за трудности проведения адекватной антимикробной терапии и потенциально высокой смертности при инфекциях, вызванных несущими их клебсиеллами. Однако структура и распространение этих плазмид изучены недостаточно. Плазмиды становятся обладателями мозаичной структуры с набором различных функциональных генетических модулей, каждый из которых, вероятно, имеет независимую филогенетическую историю. Таким образом, для исследования эпидемиологии этих сложных динамических структур необходимо применять различные методы кластеризации. В данной работе для первичного типирования последовательностей была использована программа *tge-cluster*, позволяющая проводить кластеризацию на основе извлечённых юнитигов (unitigs). Во всех девяти полученных кластерах преобладали плазмиды из Азиатского региона: во всех кластерах, кроме второго, большинство плазмид были выделены в Китае. Плазмиды из второго кластера преимущественно были выделены в Индии и обладали особой структурой аэробактинового кластера *iuc* 5. Наибольший процент плазмид, выделенных в Европе, был в кластере 0. К этому же кластеру были отнесены все (10/11), кроме одной, плазмиды из России (Европейская часть). Дополнительный филогенетический анализ этого кластера позволил установить, что плазмиды из Европейского региона образовали отдельную ветку. Так же было выявлено, что плазмиды, отнесённые к этой ветке, кодировали карбапенемазы NDM-типа. Из этого можно сделать вывод о формировании

отдельной генетической линии гибридных гипервирулентных плазмид на Европейской части территории России. Необходимы дополнительные эпидемиологические меры по сдерживанию и раннему выявлению данных опасных штаммов.

Литература/References

- Ikuta K.S., Swetschinski L.R., Robles Aguilar G., Sharara F., Mestrovic T., Gray A.P. et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2022; 400 (10369): 2221–2248. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
- Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11 (4): 589–603. doi: 10.1128/CMR.11.4.589.
- Tzouvelekis L.S., Markogiannakis A., Psichogiou M., Tassios P.T., Daikos G.L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25 (4): 682–707. doi: 10.1128/CMR.05035-11.
- Arnold R.S., Thom K.A., Sharma S., Phillips M., Kristie Johnson J., Morgan D.J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria: *South Med J*. 2011; 104 (1): 40–45. doi: 10.1097/SMJ.0b013e3181fd7d5a.
- Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A. et al. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 44 (2): 152–155. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.05.004.
- Barantsevich E.P., Churkina I.V., Barantsevich N.E., Pelkonen J., Schlyakhto E.V., Woodford N. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68 (5): 1204–1206. doi: 10.1093/jac/dks503.
- Fursova N.K., Astashkin E.I., Knyazeva A.I., Kartsev N.N., Leonova E.S., Ershova O.N. et al. The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015; 14 (1): 46. doi: 10.1186/s12941-015-0108-y.
- Liu Y.C. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess Associated With Septic Endophthalmitis. *Arch Intern Med*. 1986;146 (10): 1913. doi: 10.1001/archinte.1986.036022005701.1
- Wang J., Liu Y., Lee S.S., Yen M., Wang Y.C. *Jao-Hsien*, Wann S. et al. Primary Liver Abscess Due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 1998; 26 (6): 1434–1438. doi: 10.1086/516369.
- Rossi B., Gasperini M.L., Leflon-Guibout V., Gioanni A., De Lastours V., Rossi G. et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in cryptogenic liver abscesses, Paris, France. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24 (2): 221–229. doi: 10.3201/eid2402.170957.
- Nadasy K.A., Domiati-Saad R., Tribble M.A. Invasive *Klebsiella pneumoniae* Syndrome in North America. *Clin Infect Dis*. 2007; 45 (3): e25–e28. doi: 10.1086/519424.
- Nassif X., Sansonetti P.J. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun*. 1986; 54 (3): 603–608. doi: 10.1128/iai.54.3.603-608.1986.
- Yu W.L., Chan K.S., Ko W.C., Lee C.C., Chuang Y.C. Lower Prevalence of diabetes mellitus in patients with *Klebsiella pneumoniae* primary liver abscess caused by isolates of K1/K2 than with Non-K1/K2 capsular serotypes. *Clin Infect Dis*. 2007; 45 (11): 1529–1530. doi: 10.1086/523006.
- Russo T.A., Olson R., Fang C.T., Stoesser N., Miller M., MacDonald U. et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2018; 56 (9): e00776–18. doi: 10.1128/JCM.00776-18.
- Bulger J., MacDonald U., Olson R., Beanan J., Russo T.A. Metabolite transporter PEG344 is required for full virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain hvKP1 after pulmonary but not subcutaneous challenge. *Infect Immun*. 2017; 85 (10): e00093–17. doi: 10.1128/IAI.00093-17.
- Lin Z.wei, Zheng J. xin, Bai B., Xu G. jian, Lin F.jun, Chen Z. et al. Characteristics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: does low expression of rmpA contribute to the absence of hypervirulence? *Front Microbiol*. 2020; 11: 436. doi: 10.3389/fmicb.2020.00436.
- Walker K.A., Treat L.P., Sepúlveda V.E., Miller V.L. The small protein RmpD drives hypermucoviscosity in *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*. 2020; 11 (5): e01750–20. doi:10.1128/mBio.01750-20.
- Chen Y.T., Chang H.Y., Lai Y.C., Pan C.C., Tsai S.E., Peng H.L. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene*. 2004;337:189–198. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.008
- Wu K.M., Li L.H., Yan J.J., Tsao N., Liao T.L., Tsai H.C. et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J Bacteriol*. 2009; 191 (14): 4492–4501. doi: 10.1128/JB.00315-09.
- Shon A.S., Bajwa R.P.S., Russo T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*. 2013; 4 (2): 107–118. doi: 10.4161/viru.22718.
- Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L. et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18 (1): 37–46. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30489-9.
- Turton J., Davies F., Turton J., Perry C., Payne Z., Pike R. Hybrid resistance and virulence plasmids in «High-Risk» clones of *Klebsiella pneumoniae*, including those carrying blaNDM-5. *Microorganisms*. 2019; 7 (9): 326. doi: 10.3390/microorganisms7090326.
- Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., Solovieva E.V., Kombarova T.I., Korobova O.V. et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog Glob Health*. 2018; 112 (3): 142–151. doi: 10.1080/20477724.2018.1460949.
- Lazareva I., Ageevets V., Sopova J., Lebedeva M., Starkova P., Likholetova D. et al. The emergence of hypervirulent blaNDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital. *Infect Genet Evol*. 2020; 85:104527. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104527.
- Shaidullina E., Shelenkov A., Yanushevich Y., Mikhaylova Y., Shagin D., Alexandrova I. et al. Antimicrobial resistance and genomic characterization of OXA-48- and CTX-M-15-Co-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 recovered from nosocomial outbreak. *Antibiotics*. 2020; 9 (12): 862. doi: 10.3390/antibiotics9120862.
- Starkova P., Lazareva I., Avdeeva A., Sultjan O., Likholetova D., Ageevets V. et al. Emergence of hybrid resistance and virulence plasmids harboring new delhi metallo-β-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Antibiotics*. 2021; 10 (6): 691. doi: 10.3390/antibiotics10060691.
- Xu Y., Zhang J., Wang M., Liu M., Liu G., Qu H. et al. Mobilization of the nonconjugative virulence plasmid from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med*. 2021; 13 (1): 119. doi: 10.1186/s13073-021-00936-5.
- Spadari A., Perdigão J., Campino S., Clark T.G. Large-scale genomic analysis of global *Klebsiella pneumoniae* plasmids reveals multiple simultaneous clusters of carbapenem-resistant hypervirulent strains. *Genome Med*. 2023; 15 (1): 3. doi: 10.1186/s13073-023-01153-y.
- Cejas D., Fernández Canigia L., Rincón Cruz G., Elena A.X., Maldonado I., Gutkind G.O. et al. First isolate of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the Americas. *J Clin Microbiol*. 2014; 52 (9): 3483–3485. doi: 10.1128/JCM.00726-14.
- Compain E., Vandenbergh A., Gominet M., Genel N., Lebeaux D., Ramahafasola A. et al. Primary osteomyelitis caused by an NDM-1-producing *K. pneumoniae* strain of the highly virulent sequence type 23. *Emerg Microbes Infect*. 2017; 6 (1): 1–3. doi: 10.1038/emi.2017.43.
- Becker L., Kaase M., Pfeifer Y., Fuchs S., Reuss A., Von Laer A. et al. Genome-based analysis of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from German hospital patients, 2008–2014. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018; 7 (1): 62. doi: 10.1186/s13756-018-0352-y.
- Roulston K.J., Bharucha T., Turton J.E., Hopkins K.L., Mack D.J.F. A case of NDM-carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the UK. *JMM Case Rep*. 2018; 5 (9). doi: 10.1099/jmmcr.0.005130.
- Galata V., Fehlmann T., Backes C., Keller A. PLSDB: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47 (D1): D195–D202. doi: 10.1093/nar/gky1050.
- Olson R.D., Assaf R., Bretton T., Conrad N., Cucinell C., Davis J.J. et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res*. 2023; 51 (D1): D678–D689. doi: 10.1093/nar/gkac1003.
- Seemann T. Abricate. <https://github.com/tseemann/abricate>
- Lam M.M.C., Wick R.R., Watts S.C., Cerdeira L.T., Wyres K.L., Holt K.E. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nat Commun*. 2021; 12 (1): 4188. doi: 10.1038/s41467-021-24448-3.
- Carattoli A., Hasman H. PlasmidFinder and in silico pMLST: identification and typing of plasmid replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). In: De La Cruz F, ed. Horizontal Gene Transfer. Vol 2075. Methods in Molecular Biology. Springer US; 2020: 285–294. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7_20.
- Jolley K.A., Maiden M.C. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11 (1): 595. doi: 10.1186/1471-2105-11-595.

39. Florensa A.F., Kaas R.S., Clausen P.T.L.C., Aytan-Aktug D., Aarestrup F.M. ResFinder — an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microb Genomics*. 2022; 8 (1). doi: 10.1099/mgen.0.000748.
40. Arredondo-Alonso S., Gladstone R.A., Pöntinen A.K., Gama J.A., Schürch A.C., Lanza V.F. *et al.* Consistent typing of plasmids with the Mge-cluster pipeline. *Bioinformatics*; 2022. doi: 10.1101/2022.12.16.520696.
41. Treangen T.J., Ondov B.D., Koren S., Phillippy A.M. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intra-specific microbial genomes. *Genome Biol.* 2014; 15 (11): 524. doi: 10.1186/s13059-014-0524-x.
42. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49 (W1): W293–W296. doi: 10.1093/nar/gkab301.
43. Seemann T. mlst. <https://github.com/tseemann/mlst>

Информация об авторах

Шаповалова Валерия Владиславовна — научный сотрудник Центр постгеномных технологий, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6915-031X

Чулкова Полина Сергеевна — младший научный сотрудник, отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

Агеевец Владимир Андреевич — к. б. н., научный сотрудник, отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900

About the authors

Vlериya V. Shapovalova — Researcher, Center for Postgenomic Technologies, 1Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6915-031X

Polina S. Chulkova — Junior researcher, Department of Medical Microbiology and Molecular Epidemiology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

Vladimir A. Ageevets — Ph.D. in Biology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900

Противовирусная активность композиционного препарата дрожжевой двусpirальной РНК и интерферона альфа на модели экспериментальной гриппозной инфекции мышей

*С. Г. ГАМАЛЕЙ, М. О. СКАРНОВИЧ, Е. В. МАКАРЕВИЧ, О. Ю. МАЗУРКОВ,
Л. Н. ШИШКИНА, О. С. ИВАНОВА, Г. М. ЛЕВАГИНА, Е. Д. ДАНИЛЕНКО

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), Кольцово, Новосибирская область, Российской Федерации

Antiviral Activity of Double-Stranded Ribonucleic Acid and Interferon Alpha Composition in the Model of Experimental Influenza Infection of Mice

*SVETLANA G. GAMALEY, MAXIM O. SKARNOVICH, ELENA V. MAKAREVICH,
OLEG YU. MAZURKOV, LARISA N. SHISHKINA, OLGA S. IVANOVA,
GALINA M. LEVAGINA, ELENA D. DANILENKO

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Резюме

Высокий уровень изменчивости вирусов гриппа требует разработки, наряду с новыми специфическими средствами профилактики и лечения, препаратов-стимуляторов неспецифической устойчивости. Универсально широким спектром действия среди противовирусных препаратов обладают интерфероны и их индукторы. В ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана технология и получены композиционные препараты, содержащие индуктор интерферона двуспиральную рибонуклеиновую кислоту из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и рекомбинантный интерферон альфа-2b человека (ИФН-альфа-2b). В культурах клеток L-68 и L-929 показано наличие специфической противовирусной активности препаратов и синергидного эффекта компонентов в составе композиций. Цель работы — изучение противовирусной активности интраназальных форм композиционных препаратов, содержащих дрожжевую дsРНК и рекомбинантный интерферон альфа-2b человека, на модели летальной гриппозной инфекции мышей. Мышей аутбредной популяции ICR (CD-1) интраназально инфицировали вирусом гриппа (ВГ) A/Aichi/2/68 (H3N2). Препараты вводили интраназально за 3 ч до заражения ВГ, через 1 и 3 сут после заражения. Дозы активных компонентов при введении композиций составляли: по дsРНК — 2,5 мг/кг, по ИФН-альфа-2b — 500 МЕ/кг, 2500 МЕ/кг или 5000 МЕ/кг. Противовирусную активность препаратов оценивали по показателю гибели и средней продолжительности жизни мышей. Показано, что трёхкратное интраназальное введение инфицированным мышам по лечебно-профилактической схеме композиции в дозе 2,5 мг/кг (по дsРНК) и 2500 МЕ (по ИФН-альфа-2b) приводило к повышению числа выживших животных и средней продолжительности их жизни, по уровню сравнимых с эффектом препарата Тамифлю. Препараты сравнения дsРНК и ИФН-альфа-2b при интраназальном введении в тех же дозах в условиях данной вирусной модели противовирусного действия не оказывали. Полученные данные подтверждают перспективность дальнейшей разработки новых лекарственных форм дsРНК и интерферонов для интраназального применения в качестве средств профилактики и лечения гриппа.

Ключевые слова: индуктор интерферона; двуспиральная рибонуклеиновая кислота; дsРНК; ИФН-альфа-2b; композиция для интраназального введения; противовирусная активность; вирус гриппа; мыши

Для цитирования: Гамалей С. Г., Скарнович М. О., Макаревич Е. В., Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н., Иванова О. С., Левагина Г. М., Даниленко Е. Д. Противовирусная активность композиционного препарата дрожжевой двуспиральной РНК и интерферона альфа на модели экспериментальной гриппозной инфекции мышей. Антибиотики и химиотер. 2023; 68: 7–8: 27–33. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-27-33>.

Abstract

High variability of influenza viruses requires the development of agents for nonspecific resistance stimulation, along with the development of new drugs for prevention and treatment. Among the antiviral drugs, interferons and their inducers are known to exhibit a universally wide spectrum of action. The Institute of Medical Biotechnology, a branch of SRC VB «Vector»,

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия, 630559.
E-mail: gamaley_sg@vector.nsc.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia. E-mail: gamaley_sg@vector.nsc.ru

Rospotrebnadzor, has developed the technology and obtained pharmaceutical compositions containing an interferon inducer — double stranded ribonucleic acid (dsRNA) from the killer strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and recombinant human interferon-alpha-2b (IFN-alpha-2b). The specific antiviral activity of the preparations and synergistic effect of the components within the compositions were shown in L-68 and L-929 cell cultures. The aim of this work was to study antiviral activity of intranasal forms of the pharmaceutical compositions containing yeast dsRNA and recombinant human interferon-alpha-2b in a model of lethal influenza infection in mice. The outbred ICR/CD1 mice were intranasally infected with influenza A/Alichi/2/68 (H3N2) virus. The study compositions were intranasally administered 3 hours before infection with influenza virus, as well as 1 and 3 days post infection. The doses of active components in the administered compositions were as follows: for dsRNA — 2.5 mg/kg, for IFN-alpha-2b — 500 IU/kg, 2500 IU/kg, or 5000 IU/kg. The antiviral activity of the drugs was assessed based on the mortality rate and the average life expectancy of mice. It was shown that a three-time intranasal administration of the composition of dsRNA (2.5 mg/kg) and IFN-alpha-2b (2500 IU) into the infected mice according to therapeutic-prophylactic regimen led to an increase in the rates of survival and average life expectancy of animals, which were comparable to the effect of Tamiflu. The comparison preparations — dsRNA and IFN-alpha-2b — administered intranasally at the same doses and regimen exerted no antiviral effect in this mouse model of viral infection. The data obtained confirm the prospects for further development of new dosage forms of dsRNA and interferons for intranasal application as agents for prevention and treatment of influenza.

Keywords: *interferon inducer; double stranded ribonucleic acid; dsRNA; IFN-alpha-2b; composition for intranasal administration; antiviral activity; influenza virus; mice*

For citation: Gamalei S. G., Skarnovich M. O., Makarevich E. V., Mazurkov O. Yu., Shishkina L. N., Ivanova O. S., Levagina G. M., Danilenko E. D. Antiviral activity of double-stranded ribonucleic acid and interferon alpha composition in the model of experimental influenza infection of mice. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 7–8: 27–33. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-27-33>.

Введение

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что наиболее эффективным способом предотвращения вирусного заражения является вакцинация. Приобретённый иммунитет против сезонного гриппа значительно снижает заболеваемость и смертность во всех возрастных группах. Однако известно, что особенности генома и механизмов репликации вируса гриппа способствуют накоплению мутаций и, как следствие, возникновению штаммов, для которых наработанные в ходе вакцинации антитела могут быть недостаточно специфичными. Кроме того, нельзя не упомянуть о существовании в популяции лиц с иммунодефицитами разной природы, неспособных к формированию эффективного иммунного ответа на вакцину. Поэтому одним из главных способов лечения и борьбы с распространением гриппозной инфекции по-прежнему является использование химиотерапевтических средств специфического и неспецифического действия.

Для терапии гриппа в качестве основных противогриппозных лекарственных средств используются препараты адамантанового ряда (ремантадин, амантадин) — блокаторы ионных каналов, а также ингибиторы нейраминидазы вируса гриппа А, такие как занамивир (Реленза[®]) [1], осельтамивир (Тамифлю[®], Номидес) [2], перамишивир [2] и ланинамишивир (Авиган[®]) [2]. Несомненное преимущество специфических противогриппозных средств состоит в направленности и, как следствие, высокой эффективности противовирусного действия. Недостатками является ограниченность спектра вирусных штаммов, против которых данные средства эффективны, и

формирование вирусной резистентности, особенно быстрое в условиях длительного терапевтического воздействия препаратами у лиц с ослабленной иммунной системой [2]. В связи с этим, разработка и использование в лечебной практике средств, повышающих неспецифическую резистентность организма, в частности, интерферонов и их индукторов, остаются актуальными.

Как известно, первым барьером, противостоящим развитию инфекционного процесса при гриппе, является местная защита слизистых оболочек респираторного тракта. Это объясняет интерес к разработке противовирусных препаратов для интраназального введения [3]. Среди препаратов интерферонов (ИФН) следует отметить такие препараты, как Виферон (мазь), Гриппферон (капли), Альфарон (лиофилизат для приготовления капель), Инфагель (гель), представляющие собой лекарственные формы рекомбинантного человеческого интерферона альфа-2b (ИФН-альфа-2b) для наружного (интраназального) применения. Локальное введение экзогенного ИФН-альфа-2b обеспечивает ускоренную мобилизацию факторов противовирусной защиты слизистых в месте введения, включая активацию внутриклеточных противовирусных механизмов и комплекса клеточных иммунных реакций [4, 5]. Другим представляющим интерес классом неспецифических противовирусных средств являются индукторы интерферона, среди которых можно выделить двусpirальные рибонуклеиновые кислоты (дсРНК). На основе природных дсРНК в настоящее время созданы препараты для экстренной профилактики и лечения инфекционных заболеваний — Ридостин (препарат на основе дсРНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) и Ларифан (дсРНК из фага φ6). Двуспи-

ральные РНК благодаря сходству структуры со структурой вирусных РНК или их интермедиатов запускают каскад противовирусных реакций, одной из которых является синтез эндогенных интерферонов [6]. В настоящее время разработана интраназальная форма препарата Ридостин, обладающая противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А (штаммы A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Bishkek/01/2009 (H1N1)pdm09) [7, 8].

В источниках литературы имеются данные о синергидном эффекте ИФН и их индукторов при их сочетанном введении [9, 10]. Как было показано нами ранее в экспериментах на модели летальной гриппозной инфекции у мышей, наличие ИФН-альфа-2b в составе композиции, содержащей дсРНК из фага φb, способствовало усилению противовирусных свойств дсРНК [11].

Цель исследования — изучение противовирусной активности интраназальной формы композиционного препарата, содержащего индуктор интерферона дрожжевую дсРНК и рекомбинантный интерферон альфа-2b человека, на модели летальной гриппозной инфекции мышей.

Материал и методы

Для получения композиционных препаратов были использованы: субстанция натриевой соли двусpirальной рибонуклеиновой кислоты (На-соль дсРНК), содержащая 21,6% двусpirальной РНК, по показателям качества соответствующая ФСП 42-0769-08 (производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора); интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция (АО «Вектор-Медика»); поли-этиленгликоль 400 («Panreac», Германия); этилендиаминететрауксусная кислота динатриевая соль («AppliChem», Германия); диметилсульфоксид (ООО «Йодные Технологии и Маркетинг», Россия); натрия хлорид — 0,9%, ГОСТ 4233-77 (Россия).

Интраназальные формы композиций, содержащих дсРНК и ИФН, получали путём смешения субстанции На-соль дсРНК с ИФН-альфа-2b и вспомогательными компонентами в ламинарной системе КОЧ «Ламинар «С» с соблюдением правил асептики. Лиофилизацию растворов образцов проводили в камере лиофильной сушки «FreeZone» в автоматическом режиме с опцией пневматической укупорки. Раствор разливали во флаконы по 1 мл, замораживали при температуре минус 72°C и высушивали в течение 16 часов при температуре 22±2°C.

В экспериментах использовали композиционные препараты, содержащие субстанцию дсРНК в количестве 750 мкг и ИФН-альфа-2b в трёх концентрациях: 150 МЕ, 750 МЕ и 1500 МЕ на флакон (Композиция 1, 2 или 3, соответственно). Состав вспомогательных веществ в композициях: этилендиаминететрауксусная кислота (ЭДТА) — 0,005 мг, диметилсульфоксид — 0,005 мг, полиэтиленгликоль (ПЭГ-400) — 0,005 мг, натрия хлорид — 0,002 мг.

В качестве препаратов сравнения были использованы:

- субстанция дсРНК, представляющая смесь одноцепочечных и двусpirальных РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с содержанием дсРНК 21,6 % производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (г. Бердск Новосибирской области);
- интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция (АО «Вектор-Медика», р. п. Кольцово Новосибирской области);
- Тамифлю (Хофманн — Ля Рош Лтд., Швейцария).

Противовирусную активность композиционных препаратов исследовали в экспериментах на 90 мышах ICR (CD-1) аутбредной популяции. Возраст животных составлял 5 нед., масса тела 14–15 г. Мыши были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской обл.).

Содержание мышей и эксперименты на них осуществлялись в соответствии с российскими и международными требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [12].

Для воспроизведения вирусной модели использовали адаптированный к мышам вирус гриппа (ВГ) A/Aichi/2/68 (H3N2), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Мышей, анестезированных изофлураном с помощью установки для газовой анестезии SomnoFlo (Kent Scientific Corporation, США), интраназально заражали ВГ в дозе 10 ЛД₅₀ в объёме 40 мкл суммарно в обе ноздри.

Для оценки противовирусной активности препаратов животных распределяли на 9 экспериментальных групп случайным образом, по 10 особей в группе.

Животным первой, второй и третьей опытных групп интраназально вводили Композицию 1, Композицию 2 или Композицию 3, соответственно. Доза дсРНК в композициях была одинаковой и составляла 2,5 мг/кг (50 мкг на мышь); доза ИФН-альфа-2b при введении в составе Композиции 1 — 500 МЕ/кг, Композиции 2 — 2500 МЕ/кг, Композиции 3 — 5000 МЕ/кг (10 МЕ; 50 МЕ или 100 МЕ на мышь, соответственно). Животные четвёртой группы (группы сравнения) получали интраназально раствор субстанции дсРНК в дозе 2,5 мг/кг. ИФН-альфа-2b вводили мышам пятой, шестой и седьмой групп сравнения в дозах 500 МЕ/кг, 2500 МЕ/кг или 5000 МЕ/кг, соответственно. Композиционные препараты и препараты сравнения вводили интраназально за 3 ч до заражения ВГ, через 1 и 3 сут после заражения в объёме 25 мкл/мышь суммарно.

Положительным контролем являлся противовирусный препарат Тамифлю (Ля Рош Лтд., Швейцария), который вводили мышам восьмой группы перорально в дозе 15 мг/кг через 1 ч после заражения ВГ и далее дважды в сутки в течение 4 сут после заражения. Животные, инфицированные ВГ и не получавшие препаратов, составляли группу отрицательного контроля (группа 9).

Противовирусную активность препаратов оценивали по показателю гибели животных в течение 16 сут наблюдения после заражения ВГ, рассчитывали коэффициент защиты (КЗ) и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей. За максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 сут после заражения ВГ, то есть гарантированное время прекращения гибели инфицированных мышей.

Статистическую обработку и сравнение данных, полученных при изучении противовирусной активности препаратов, осуществляли с помощью пакета компьютерных программ анализа данных «Statistica 12». Для проверки статистических гипотез о виде распределения показателей применяли критерий Колмогорова–Смирнова при вероятности ошибки $p > 0,10$. СПЖ представлены в виде $M \pm Sm$, где M — среднее арифметическое значение и Sm — стандартное отклонение. Сравнение СПЖ мышей в разных группах проводили с использованием U -критерия Манна–Уитни. Для оценки межгрупповых различий доли выживших животных использовали критерий χ^2 с учётом поправки Йетса для малых выборок. Различия показателей выживаемости животных оценивали с помощью кривых Каплана–Майера по логранговому критерию в компьютерной программе анализа данных «Statistica 12». Отличия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Введение препарата Тамифлю в течение 5 сут после заражения летальной дозой вируса гриппа

A/Aichi/2/68 (H3N2) защищало от гибели 70% инфицированных мышей (таблица). Средняя продолжительность жизни мышей этой группы значительно превышала показатели контрольных животных (более, чем на 7 дней). Эти данные подтверждают адекватность использованной вирусной модели в экспериментах на мышах и её чувствительность к противовирусным препаратам.

Введение мышам Композиции 2 по лечебно-профилактической схеме обеспечивало защиту 50% инфицированных животных при увеличении средней продолжительности жизни в 2 раза по сравнению с контрольной группой (см. таблицу). Показатели выживаемости мышей, которым вво-

дили Композицию 2, статистически не отличались от показателей животных группы сравнения «Тамифлю».

Число выживших животных, которым вводили Композицию 1, значимо не отличалось от показателей мышей с введением Тамифлю, однако средняя продолжительность жизни мышей этой группы была в 1,58 раза меньше, чем в группе «Тамифлю» (различия статистически значимы, $p \leq 0,05$) (см. таблицу).

В группах мышей, которым вводили Композицию 3 или ИФН-альфа-2b в дозах 2500 МЕ/кг или 5000 МЕ/кг, к концу срока наблюдения выжило всего по 1 животному из 10.

Показатели выживаемости мышей, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10 LD₅₀ при введении препаратов дсРНК и ИФН-альфа-2b и в контроле

Survival rates of mice infected with 10 LD₅₀ of influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) virus in groups receiving dsRNA and IFN-alpha-2b preparations and in control

№ группы	Препарат	Доза/схема введения препарата	Число (доля) выживших животных	К3 (%)	СПЖ (сут), M±Sm
1	Композиция 1 (n=10)	дсРНК — 2,5 мг/кг, ИФН-альфа-2b — 500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	3 (30 %)	30	8,5±5,23##
2	Композиция 2 (n=10)	дсРНК — 2,5 мг/кг, ИФН-альфа-2b — 2500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	5* (50 %)	50	11,6±4,74**
3	Композиция 3 (n=10)	дсРНК — 2,5 мг/кг, ИФН-альфа-2b — 5000 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	1# (10 %)	10	7,1±3,41##
4	Субстанция дсРНК	2,5 мг/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	0# (0 %)	0	6,0±0,67##
5	ИФН-альфа-2b, 10 МЕ/мышь (n=10)	500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	0# (0 %)	0	6,7±1,06##
6	ИФН-альфа-2b, 50 МЕ/мышь (n=10)	2500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	1# (10 %)	10	6,5±3,44##
7	ИФН-альфа-2b, 100 МЕ/мышь (n=10)	5000 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	1# (10 %)	10	6,6±3,37##
8	Тамифлю (n=10)	15 мг/кг 2 раза в сутки, п/о через 1 ч п/з ВГ и далее в течение 4-х сут п/з	7* (70 %)	70	13,4±4,20**
9	Контроль ВГ (n=10)	н/в	0 (0 %)	н/о	5,7±1,34

Примечание. n — число животных в каждой группе; и/н — интраназально; п/о — перорально; д/з — до заражения; п/з — после заражения; н/в — препараты не вводили; н/о — показатель не определяют; К3 — коэффициент защиты (рассчитывали по формуле: К3 = % гибели в контроле — % гибели в опыте); СПЖ — средняя продолжительность жизни (за максимальный срок жизни выживших животных принимали 16 сут, эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели инфицированных ВГ мышей); * — отличие от контроля по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; # — отличие от Тамифлю по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; ** — отличие от контроля по U-критерию Манна–Уитни при $p \leq 0,05$; ## — отличие от Тамифлю по U-критерию Манна–Уитни при $p \leq 0,05$; M — среднее арифметическое значение; Sm — стандартное отклонение.

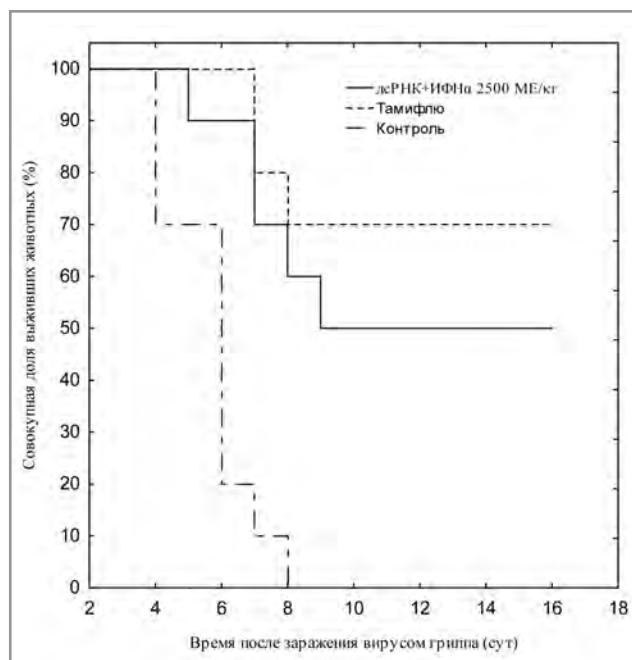
Note. n — number of animals in each group; и/н — intranasally; п/о — per os; д/з — before infection; п/з — post infection; н/в — drugs non-administered; н/о — indicator non-determined; К3 (PC) — protection coefficient (calculated according to the formula: PC = % death in the control — % death in the experiment); СПЖ — average life expectancy (a maximum life span of surviving animals was taken as a 16-day period, empirically established, guaranteed time of when the mortality in mice infected with influenza virus has stopped in mice infected with influenza virus); * — difference from the control group according to the χ^2 criterion, $P \leq 0,05$; # — difference from Tamiflu according to the χ^2 criterion, $P \leq 0,05$; ** — difference from the control according to the Mann–Whitney U-test, $P \leq 0,05$; ## — difference from Tamiflu according to the Mann–Whitney U-test, $P \leq 0,05$; M — arithmetic mean; Sm — standard deviation.

Введение субстанции дсРНК в дозе 2,5 мг/кг или ИФН-альфа-2b в дозе 500 МЕ/кг не обеспечивало защиты инфицированных мышей: в этих группах, как и в контроле, была отмечена 100% гибель животных (см. таблицу).

Анализ графиков выживаемости, построенных по методу Каплана–Майера, представленных на рисунке, выявляет значимые отличия между контрольной группой мышей, инфицированных штаммом ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀, и группами инфицированных мышей, получавших Тамифлю ($p=0,00039$) и Композицию 2 ($p=0,00326$) (рисунок). При этом отличий по выживаемости инфицированных ВГ мышей при введении Тамифлю и Композиции 2 не обнаружено ($p=0,36430$). Следует отметить, что отличий в выживаемости по логранговому критерию инфицированных ВГ мышей при введении Композиций 1 и 3, а также препаратов сравнения дсРНК (субстанция) и ИФН-альфа-2b в дозах 500, 2500 и 5000 МЕ/кг (на графиках не представлены) от контрольной группы инфицированных ВГ мышей не обнаружено ($p>0,05$).

Таким образом, в результате экспериментального изучения на мышах показано, что Композиция 2, содержащая ИФН-альфа-2b и индуктор интерферона дсРНК, при трёхкратном интраназальном применении в дозе (2,5 мг дсРНК и 2500 МЕ ИФН-альфа-2b)/кг проявляет противовирусную активность в отношении ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2), чего не наблюдается после введения компонентов композиции.

Полученные данные относительно усиления противовирусного ответа при совместном использовании интерферона и индуктора интерферона согласуются с результатами других исследователей и собственными экспериментальными данными. Так, авторы статьи [9] в экспериментах на первичных макрофагах, выделенных из брюшной полости мышей, чувствительных к флавивирусам человека (штамм WN), а также трёх линиях мышей с резистентностью к флавивирусам показали, что примирение макрофагов ИФН-альфа/бета либо синтетической двухцепочечной РНК polyI:polyC приводило к преходящему снижению репликации флавивируса в макрофагах восприимчивых мышей, в отличие от устойчивых. При этом предварительная обработка клеток ИФН-альфа/бета в сочетании с polyI:polyC обеспечивала выраженный противовирусный ответ, который полностью предотвращал репликацию флавивируса в макрофагах мышей данного типа. Кроме того, показано, что для развития эффективного противовирусного ответа против вируса Западного Нила макрофагов, выделенных из крови здоровых доноров-людей, в качестве кофактора для реализации эффекта ИФН необходима дцРНК. Эти результаты свидетельствуют о том, что ис-



Графики выживаемости животных, построенные по методу Каплана–Майера, при заражении штаммом ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀ в контрольной группе и при введении препаратов дсРНК+ИФН-альфа-2b (2500 МЕ/кг) и Тамифлю.

Примечание. «+» — окончание срока наблюдения, т. е. эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели мышей, инфицированных ВГ.

Kaplan-Meier animal survival graphs, post infection of mice with influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) virus at a dose of 10 LD₅₀ in the control group and in the groups receiving dsRNA + IFN-alpha-2b (2500 IU/ kg) and Tamiflu.

Note. «+» — end of the observation period, i. e. empirically established, guaranteed time of death cessation in mice infected with influenza virus.

пользование ИФН-альфа/бета в сочетании с дцРНК способствует усилиению противовирусного эффекта против флавивирусов, что приводит к полной эрадикации вируса из клеток [9].

Аналогичные данные были получены нами ранее в экспериментах по изучению противовирусных свойств композиций природных дсРНК и рекомбинантных ИФН. Было показано, что композиция дсРНК фага ϕ 6 и рекомбинантного ИФН-альфа-2b человека в дозе 2,5 мг/кг (по дсРНК) и 500 МЕ/кг (по ИФН), в отличие от компонентов композиции, обладала способностью защищать инфицированных мышей от летальной дозы вируса гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) как при внутрибрюшинном, так и интраназальном применении по лечебно-профилактической схеме [11].

Заключение

На модели гриппозной инфекции показано, что интраназальная форма композиционного

препарата дсРНК и ИФН-альфа-2b в дозе 2,5 мг/кг по дсРНК и 2500 МЕ/кг по ИФН-альфа-2b при лечебно-профилактической схеме применения повышает выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей, инфицированных летальной дозой вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Защитный эффект препарата был сравним с эффектом препарата Тамифлю. Снижение дозы ИФН-альфа-2b в составе композиции ослабляло противовирусные свойства препарата, повышение дозы ИФН-альфа-2b нивелировало эффект.

Полученные данные подтверждают перспективность и обоснованность продолжения работ по завершению разработки новой лекарственной формы препарата для интраназального применения, содержащего в своём составе дсРНК и ИФН, в качестве средства профилактики и лечения гриппа и других острых респираторных вирусных заболеваний.

Литература/References

1. Дерябин П.Г., Галегов Г.А., Ботиков А.Г., Бурцева В.И., Мишин Д.В., Щелканов М.Ю. Действие субстанции занамивир на инфекцию, вызванную высоковирулентным вирусом гриппа птиц A/H5N1 в культурах клеток. Вопросы вирусологии. 2011; 56 (1): 21–24. [Deryabin PG., Galegov G.A., Botikov A.G., Burtseva V.I., Mishin D.V., Shchelkanov M.Yu. Effect of zanamivir substance on infection induced by highly pathogenic avian influenza A/H5N1 in cell cultures. Voprosy Virusologii. 2011; 56 (1): 21-24 (in Russian)]
2. Бурцева Е.И., Бреслав Н.В., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Малышев Н.А., и др. Ингибиторы нейраминидазы вирусов гриппа: эффективность в постпандемический период. Эффективная фармакотерапия. 2017; (3): 28–32. <https://nomides.ru/files/ingibitory-nejraminidazy-virusov-grippa.-jeffektivnost-v-postpandemicheskij-period.pdf> (in Russian)
3. Рязанцев С.В., Хмельницкая Н.М., Тырнова Е.В. Роль слизистой оболочки в защите ЛОР органов от потенциально патогенных для организма антигенных факторов. Вестник отоларингологии. 2000; (3): 60–63. [Ryazantsev S.V., Khmel'nitskaya N.M., Tyrnova Ye.V. Rol' slizistoy obolochki v zashchite LOR organov ot potentsial'no patogennykh dlya organizma antigennykh faktorov. Vestnik Otolaringologii. 2000; (3): 60–63. (in Russian)]
4. Oslund K.L., Zhou X., Lee B., Zhu L., Duong T., Shih R. et al. Synergistic up-regulation of CXCL10 by virus and IFN- γ in human airway epithelial cells. PLoS One. 2014; 9 (7): e100978. doi: 10.1371/journal.pone.0100978.
5. Осидак Л.В., Афанасьева О.И., Головачева Е.Г., Гончар В.В., Писарева М.М., Дондурей Е.А., и др. Рекомбинантный интерферон α -2b (Гриппферон) в терапии и профилактике ОРВИ. Фарматека. 2020; 27 (1): 80–91. doi: <https://doi.org/10.18565/pharmateca.2020.1.80-91>. [Osidak L.V., Afanasyeva O.I., Golovacheva E.G., Gonchar V.V., Pisareva M.M., Dondurey E.A. et.al. Recombinant interferon α -2b (Grippferon) in the treatment and prevention of acute respiratory viral infections. Pharmateka; 27 (1): 80–91. doi: <https://doi.org/10.18565/pharmateca.2020.1.80-91>. (in Russian)]
6. Даниленко Е.Д., Белкина А.О., Сысоева Г.М. Создание лекарственных препаратов на основе высокополимерных двусpirальных РНК для противовирусной и противоопухолевой терапии. Биомедицинская химия. 2019; 65 (4): 277–293. doi: <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>. [Danilenko E.D., Belkina A.O., Syssoeva G.M. Development of drugs on the basis of high-polymeric double-stranded RNA for antiviral and antitumor therapy. Biomeditsinskaya Khimiya. 2019; 65 (4): 277–293. doi: <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>. (in Russian)]
7. Иванова О.С., Левагина Г.М., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишикина Л.Н., Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д. Получение и характеристика препарата двуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для интраназального применения. Биофармацевтический журнал. 2019; 11 (4): 29–33. [Ivanova O.S., Levagina G.M., Skarnovich M.O., Skarnovich M.A., Shishikina L.N., Gamalei S.G., Danilenko E.D. Obtaining and characterization of double stranded RNA preparation from *Saccharomyces cerevisiae* yeast for intranasal application. Biofarmatsevicheskii Zhurnal. 2019; 11 (4): 29–33. (in Russian)]
8. Гамалей С. Г., Шимина Г. Г., Цыпленкова Е. С., Симакова О. В., Скарнович М. О., Скарнович М. А. и др. Изучение противовирусной активности и фармакологической безопасности интраназальной формы двуспиральной рибонуклеиновой кислоты. Антибиотики и химиотер. 2022; 67: (9–10): 42–48. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-42-48>. [Gamalei S.G., Shimina G.G., Tsyplenkova E.S., Simakova O.V., Skarnovich M.O., Skarnovich M.A. et. al. Study on antiviral activity and pharmacological safety of double-stranded ribonucleic acid for intranasal administration. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2022; 67 (9–10): 42–48. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-42-48>. (in Russian)]
9. Pantelic L., Sivakumaran H., Urosevic N. Differential induction of antiviral effects against West Nile virus in primary mouse macrophages derived from flavivirus-susceptible and congenic resistant mice by alpha/beta interferon and poly(I-C). J Virol. 2005; 79 (3): 1753–64. doi: 10.1128/JVI.79.3.1753-1764.2005.
10. Marcus P.I., Sekellick M.J. Combined sequential treatment with interferon and dsRNA abrogates virus resistance to interferon action. J Interferon Cytokine Res. 2001; 21 (6): 423–9. doi: 10.1089/10799001750277907.
11. Сысоева Г.М., Батенева А.В., Гамалей С.Г., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишикина Л.Н. и др. Иммуномодулирующие и противовирусные свойства композиционного препарата двуспиральной РНК и интерферона альфа. Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и защиты прав потребителей: Сб. статей, посвящённых 95-летию службы. Новосибирск: ООО «Альфа-Порт». 2017; 201–207. [Syssoeva G.M., Bateneva A.V., Gamalei S.G., Skarnovich M.O., Skarnovich M.A., Shishikina L.N. et al. Immunomoduliruyushchiye i protivovirusnyye svoystva kompozitsionnogo preparata dvuspiral'noy RNK i interferona al'fa. In: Aktual'nyye voprosy obespecheniya sanitarno-epidemiologicheskogo potrebleniya naseleniya i zashchity prav potrebitelyey: Sbornik statey, posvyashchennykh 95-letiyu sluzhby. Novosibirsk: OOO «Al'fa-Porte». 2017; 201–207. (in Russian)]
12. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Пер. с англ. RusLasa. С-ПБ; 2012. Доступно по: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf. Ссылка активна на 31.05.2023. [Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Translated by RusLasa. S-PB; 2012.] Доступно по: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf. Ссылка активна на 31.05.2023.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование проведено в рамках работ по выполнению государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, тема ГЗ-38/21.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Участие авторов. Гамалей С. Г. — интерпретация результатов, написание статьи; Скарнович М. О., Макаревич Е. В., Мазурков О. Ю. — оценка противовирусных свойств препаратов; Шишикина Л. Н. — анализ и интерпретация данных о противовирусной активности препаратов; Иванова О. С. — получение и характеристизация интраназальной формы препаратов дсРНК и ИФН-альфа-2b; Левагина Г. М. — выбор рецептуры интраназальной формы препарата дсРНК и ИФН-альфа-2b; Даниленко Е. Д. — постановка задачи, окончательное редактирование статьи.

Информация об авторах

Гамалей Светлана Георгиевна — зав. отделом биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Российская Федерация. ORCID-ID: 0000-0002-7441-333X. ResearcherID: B-7418-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6593-3420. Scopus Author ID: 6504003751

Скарнович Максим Олегович — старший научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация. eLIBRARY SPIN-код: 8405-5175. Scopus Author ID: 57189059427

Макаревич Елена Викторовна — научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация. eLIBRARY SPIN-код: 7291-6594. Scopus Author ID: 56624524300

Мазурков Олег Юрьевич — к. б. н., научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация. eLIBRARY SPIN-код: 3512-3621. Scopus Author ID: 57189054216

Шишкина Лариса Николаевна — д. б. н., зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация. ORCID ID: 0000-0002-8264-0217. ResearcherID: B-2263-2014. eLIBRARY SPIN-код: 7165-4367. Scopus Author ID: 35316454500

Иванова Ольга Сергеевна — к. б. н., научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Российская Федерация. eLIBRARY SPIN-код: 4165-6310

Левагина Галина Михайловна — к. б. н., зав. отделом разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Российская Федерация. ORCID ID: 0000-0002-0394-9698. ResearcherID: C-7590-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6837-4940. Scopus Author ID: 6506245503

Даниленко Елена Дмитриевна — к. б. н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Российская Федерация. ORCID ID: 0000-0001-5026-1602. ResearcherID: A-7083-2014. eLIBRARY SPIN-код: 1388-4127. Scopus Author ID: 7004245682

About the authors

Svetlana G. Gamaley — Head of the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region, Russia. ORCID-ID: 0000-0002-7441-333X. ResearcherID: B-7418-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6593-3420. Scopus Author ID: 6504003751

Maxim O. Skarnovich — Senior researcher, Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 8405-5175. Scopus Author ID: 57189059427

Elena V. Makarevich — Researcher, Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 7291-6594. Scopus Author ID: 56624524300

Oleg Yu. Mazurkov — Ph. D. in Biology, Researcher, Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 3512-3621. Scopus Author ID: 57189054216

Larisa N. Shishkina — D. Sc. in Biology, Head of the Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID ID: 0000-0002-8264-0217. ResearcherID: B-2263-2014. eLIBRARY SPIN-код: 7165-4367. Scopus Author ID: 35316454500

Olga S. Ivanova — Ph. D. in Biology, Researcher, Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region, Russia. ORCID ID: 0000-0002-4243-3600. eLIBRARY SPIN-код: 4165-6310. Scopus Author ID: 55893895600

Galina M. Levagina — Ph. D. in Biology, Head of the Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0394-9698. ResearcherID: C-7590-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6837-4940. Scopus Author ID: 6506245503

Elena D. Danilenko — Ph. D. in Biology, Director of the Institute of Medical Biotechnology, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region, Russia. ORCID ID: 0000-0001-5026-1602. ResearcherID: A-7083-2014. eLIBRARY SPIN-код: 1388-4127. Scopus Author ID: 7004245682

Анализ распределения генетических факторов, ассоциированных с тяжёлым течением COVID-19, в этнических группах Восточного Кавказа

*Ш. П. АБДУЛЛАЕВ¹, К. М.-Б. МАММАЕВ², Н. П. ДЕНИСЕНКО¹,
И. И. ТЕМИРБУЛАТОВ¹, А. А. КАЧАНОВА¹, Е. В. МИХАЙЛЕНКО³, А. В. КРЮКОВ¹,
Т. Т. ВАЛИЕВ¹, К. Б. МИРЗАЕВ¹, С. Н. МАММАЕВ², Д. А. СЫЧЕВ¹

¹ ФГБОУ ДПО Российской медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

² Дагестанский государственный медицинский университет, Махачкала, Россия

³ Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Distribution of Genetic Factors Associated with Severe COVID-19 in Ethnic Groups of the Eastern Caucasus

*SHERZOD P. ABDULLAEV¹, KAMAL M.-B. MAMMAEV², NATALIA P. DENISENKO¹,
ILYAS I. TEMIRBULATOV¹, ANASTASIA A. KACHANOVA¹, ELIZAVETA V. MIKHAYLENKO³,
ALEXANDER V. KRYUKOV¹, TIMUR T. VALIEV¹, KARIN B. MIRZAEV¹,
SULEIMAN N. MAMMAEV², DMITRY A. SYCHEV¹

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

² Dagestan State Medical University, Makhachkala, Russia

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Резюме

Обоснование. Для COVID-19 были выявлены генетические маркеры *rs11385942 G>GA* и *rs657152 C>A* тяжести заболевания. Изучение распространённости клинически значимых генетических маркеров может быть полезно для разработки регион-специфических подходов борьбы с заболеванием, учитываяющих в том числе этнический состав территории, что особенно актуально для России. Учитывая этническую гетерогенность населения республики Дагестан, данный регион был выбран в качестве примера для изучения характера распределения интересующих маркеров тяжести COVID-19. **Цель исследования** — изучить распространённость маркеров *rs11385942* и *rs657152* среди пяти этнических групп, проживающих на территории Дагестана. **Материал и методы.** В исследовании приняли участие 605 здоровых добровольцев (158 мужчин и 447 женщин) из пяти разных автохтонных этнических групп, проживающих на территории республики Дагестан: 118 аварцев, 121 даргинцев, 116 лакцев, 127 кумыков и 123 лезгина. Материалом для определения полиморфизмов служила кровь. Носительство полиморфных маркеров определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. **Результаты.** Распространённость *rs11385942 G>GA* находится в диапазоне от 10,17% среди аварцев до 15,04% среди лезгинов, были выявлены значимые различия в сравнении с данными по русской этнической группой из источников литературы. Второй маркер *rs657152 A>C* в изученных группах распределён относительно гомогенно, без значимых различий и соотносится с данными по частоте маркера среди русских, в популяциях на европейском и мировом уровне — 50–60%. **Заключение.** В локальных этнических группах Дагестана нами было показано, что между собой такие группы не отличаются по носительству обоих изученных маркеров тяжести COVID-19. Вместе с тем, по *rs11385942 G>GA* частота в проанализированных группах в среднем была выше в сравнении с русскими и средним значением для европейских популяций.

Ключевые слова: COVID-19; *rs11385942*; *rs657152*; этнические группы Дагестана; тяжёлость заболевания; генетическая чувствительность к COVID-19

Для цитирования: Абдуллаев Ш. П., Маммаев К. М.-Б., Денисенко Н. П., Темирбулатов И. А., Качанова А. А., Михайленко Е. В., Крюков А. В., Валиев Т. Т., Мирзает К. Б., Маммаев С. Н., Сычев Д. А. Анализ распределения генетических факторов, ассоциированных с тяжёлым течением COVID-19, в этнических группах Восточного Кавказа. Антибиотики и химиотерапия. 2023; 68: 7–8: 34–41. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-34-41>.

Abstract

Background. Previously, genetic markers *rs11385942 G>GA* and *rs657152 C>A* of disease severity were identified for COVID-19. The study of the prevalence of clinically significant genetic markers may be useful for the development of region-specific approaches to disease control, considering, among other things, the ethnic composition of the territory, which is especially relevant for Russia. Based on the ethnic heterogeneity of the population of the Republic of Dagestan,

© Коллектив авторов, 2023

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

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 2/1 Barrikadnaya st., bld. 1, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, 125993 Russia. E-mail: abdullaevsp@gmail.com

this region was chosen as an example to study the distribution of COVID-19 severity markers of interest. **Objective.** Investigation of the prevalence of *rs11385942 G>GA* and *rs657152 C>A* markers among five ethnic groups residing in Dagestan. **Methods.** The study included 605 healthy volunteers (158 men and 447 women) from five different autochthonous ethnic groups living in the Republic of Dagestan: 118 Avars, 121 Dargins, 116 Laks, 127 Kumyks, and 123 Lezgins. Blood served as a material for determining polymorphisms. Carriage of polymorphic markers was determined by real-time polymerase chain reaction method. **Results.** The prevalence of *rs11385942 G>GA* marker ranges from 10.17% among Avars to 15.04% among Lezgins; significant differences were found in comparison with Russian ethnic group from literature sources. The second marker – *rs657152 A>C* – is distributed relatively homogeneously in the studied groups, without significant differences, and correlates with the data on the frequency of marker detection among Russians, as well as among European populations and worldwide – 50–60%. **Conclusion.** No differences were found within the ethnic groups of Dagestan in the carriage of both studied COVID-19 severity markers. At the same time, the *rs11385942 G>GA* marker detection frequency in the analyzed groups was on average higher in comparison with Russians and the average values for European populations.

Keywords: COVID-19; *rs11385942; rs657152*; ethnic groups of Dagestan; disease severity; genetic susceptibility to COVID-19

For citation: Abdullaev Sh. P., Mammaev K. M.-B., Denisenko N. P., Temirbulatov I. A., Kachanova A. A., Mikhaylenko E. V., Kryukov A. V., Valiev T. T., Mirzaev K. B., Mammaev S. N., Sychev D. A. Distribution of genetic factors associated with severe COVID-19 in ethnic groups of the Eastern Caucasus. *Antibiotiki i Khimioter* = Antibiotics and Chemotherapy. 2023; 68: 7–8: 34–41. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-34-41>.

Введение

5 мая 2023 г. Всемирная организация здравоохранения объявила об окончании пандемии COVID-19. По всему миру за три года заболевание унесло почти 7 млн жизней [1] и оказалось сильнейшим вызовом для систем здравоохранения всех стран.

В первые волны вирусного заболевания проявления COVID-19 могли варьировать от бессимптомного состояния до тяжёлой дыхательной недостаточности с развитием острого респираторного дистресс-синдрома [2]. Наиболее распространёнными симптомами заболевания были высокая температура, сухой кашель, утомляемость, одышка, миалгии [3, 4]. Пациенты пожилого возраста, с сопутствующими заболеваниями (сердечно-сосудистой системы, сахарный диабет) подвержены наиболее высокому риску развития тяжёлых форм COVID-19 и смерти [5, 6]. COVID-19 главным образом поражает дыхательную систему, тогда как другие органы задействованы в меньшей степени [7].

Анализ статистических отчётов международных организаций, аккумулирующих данные по заболеваемости и смертности населения от COVID-19, показывает высокую неоднородность таких показателей в разных странах и регионах. Так, заболеваемость COVID-19 в странах Северной Европы (Дания, Норвегия, Финляндия, Эстония) оказалась относительно низкой. В то время как южные страны перенесли более высокий пик заболеваемости с высоким уровнем смертности (Италия, Испания, Франция) [8]. Объяснением наблюдаемого явления может быть уровень и охват медицинской помощью населения разных стран, структура системы здравоохранения, различная политика по предотвращению распространения вируса SARS-CoV-2, проводимая правительствами стран, мутации и возникновение новых штаммов вируса — все те собы-

тия, свидетелями которых мы были на протяжении последних 3 лет.

Некоторыми исследовательскими группами проводилась попытка поиска корреляции между параметрами заболеваемости и смертности от COVID-19 и уровнями витамина D, в том числе в зависимости от мест проживания [9, 10]. Другие авторы концентрировали усилия на оценке вклада генетических факторов на течение COVID-19. Так, в работе D. Ellinghaus и со-авт. [11] было проведено GWAS исследование и выявлена ассоциации носительства минорных аллелей полиморфизмов *rs11385942* (G>GA замена) в локусе 3p21.31 и *rs657152* (C>A замена) в локусе 9q34.2 с тяжёлыми формами дыхательной недостаточности у пациентов с COVID-19 [11]: сигнал в локусе 3p21.31 охватывал гены *SLC6A20, LZTFL1, CCR9, FYCO1, CXCR6* и *XCR*, тогда как сигнал ассоциации в локусе 9q34.2 совпал с локусом группы крови ABO. Авторы сделали заключение о возможной роли кластеров генов 3p21.31 и группы крови ABO как предиктора восприимчивости COVID-19 у пациентов с дыхательной недостаточностью [11].

Состав населения России характеризуется этнической неоднородностью с наличием регионов компактного проживания различных этнических групп. В условиях этногеографического разнообразия населения страны знание распределения клинически релевантных маркеров среди популяций может стать полезным инструментом разработки специфических для конкретного региона подходов персонализации тактики борьбы с заболеванием. Учитывая опыт пандемии COVID-19, когда в разных регионах России фиксировалась разная статистика эпидемиологических показателей заболеваемости, разработка региональных алгоритмов на основе знания распределения генетических маркеров предрасположенности

может быть полезной. Цель работы — изучить распространённость маркеров *rs11385942 G>GA* и *rs657152 C>A* на примере этнических групп, проживающих на территории Дагестана. Выбор данного региона был обусловлен этническими и географическими особенностями региона, где на небольшой территории изолировано живут группы, характеризующиеся генетической гетерогенностью. Ранее было показано, что на уровне региона выявляется большая вариабельность носительства значимых фармакогенетических маркеров, ассоциированных с чувствительностью к препаратам, определяющих их эффективность и безопасность, среди местного населения представителей различных этнических групп [12, 13]. Те же тренды ожидаются в результатах анализа распределения маркеров чувствительности к заболеваниям (в частности COVID-19), что являлось целью данного исследования.

Материал и методы

Этический комитет. Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией и было одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Москва. Перед включением в исследование от всех участников было получено письменное информированное согласие на русском языке. Согласно условиям информированного согласия, все результаты исследования могут быть использованы в научных целях без раскрытия персональных идентификаторов.

Изучаемая популяция. В исследовании приняли участие 605 здоровых добровольцев (158 мужчин и 447 женщин) из пяти разных автохтонных этнических групп, проживающих на территории республики Дагестан: 118 аварцев, 121 даргинец, 116 лакцев, 127 кумыков и 123 лезгина.

Этническая принадлежность определялась путём самоидентификации участников и их родителей. Как показано в ранее проведённых исследованиях, отмечается высокая корреляция между использованным методом самоидентификации и определением микросателлитных маркеров этнической

принадлежности [14]. В исследование не включали потомков разноэтнических браков.

Распространённость аллельных вариантов *rs11385942 G>GA* и *rs657152 C>A* среди изучаемых групп сравнивали между собой и с частотой встречаемости среди русских — этнической группы наиболее многочисленной в России.

Генотипирование. Материалом для определения генетических полиморфизмов послужили 4 мл крови из вен локтевого сгиба, собранные с помощью вакуумной системы для взятия венозной крови VACUETTE (Greiner Bio-One, Австрия) в пробирки с ЭДТА. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора реагентов «ДНК-Экстрап-1» (ЗАО «Синтол», Москва, Россия).

Носительство полиморфных маркеров *rs11385942 G>GA* и *rs657152 C>A* выявлялось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью наборов реагентов TaqMan® SNP Genotyping Assays и TaqMan Universal Master Mix II, без UNG (Applied Biosystems, Foster City, США) в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР-анализ проводился на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Статистическая обработка. Оценивалось соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга с использованием критерия χ^2 (Пирсона) (при $p>0,05$ равновесие выполняется). Для оценки различий частот встречаемости различных аллелей между группами использовали точный тест Фишера. В качестве средств статистической обработки применялся пакет программ IBM SPSS Statistics 22, GraphPad InStat. Для всех результатов статистически значимым считали значение $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

По аллельному варианту *rs11385942 G>GA* распределение генотипов во всех изучаемых выборках согласуется с законом Харди–Вайнберга ($p>0,05$) (табл. 1). Тогда как по аллельному варианту *rs657152 A>C* данное соответствие не соблюдалось только для аварской группы ($p<0,05$), что может быть связано с объёмом выборки, отсутствием мутаций по гену и/или другими факторами (табл. 2).

Далее было проведено сравнение частот аллелей *rs11385942 G>GA* и *rs657152 A>C* в изучаемых

Таблица 1. Частота генотипов и аллелей *rs11385942 G>GA* в изучаемых этнических группах
Table 1. Distribution of genotypes and alleles of *rs11385942 G>GA* marker in the studied ethnic groups

Этническая группа	N	Частота	Генотип, n (%)			Соответствие распределению по закону Харди–Вайнберга	
			GG	G/GA	GA	χ^2	p
Аварцы	118	Набл.	95	22	1	0,0493	0,9757
		Ожид.	95,2	21,6	1,2		
		%	80,5	18,6	0,8		
Даргинцы	121	Набл.	96	24	1	0,1414	0,9317
		Ожид.	96,4	23,2	1,4		
		%	79,3	19,8	0,8		
Лакцы	116	Набл.	86	28	2	0,0261	0,9870
		Ожид.	86,2	27,6	2,2		
		%	74,1	24,1	1,7		
Кумыки	127	Набл.	105	19	3	3,1316	0,2089
		Ожид.	103,2	22,5	1,2		
		%	82,7	15,0	2,4		
Лезгины	123	Набл.	89	31	3	0,0235	0,9883
		Ожид.	88,8	31,4	2,8		
		%	72,4	25,2	2,4		

Таблица 2. Частота генотипов и аллелей rs657152 A>C в изучаемых этнических группах
Table 2. Distribution of genotypes and alleles of rs657152 A>C marker in the studied ethnic groups

Этническая группа	N	Частота	Генотип, n (%)			Соответствие распределению по закону Харди–Вайнберга	
			AA	AC	CC	χ^2	p
Аварцы	118	Набл.	19	73	26	6,8910	0,0319
		Ожид.	26,1	58,8	33,1		
		%	16,1	61,9	22,0		
Даргинцы	121	Набл.	24	60	37	0,0013	0,9993
		Ожид.	24,1	59,8	37,1		
		%	19,8	49,6	30,6		
Лакцы	116	Набл.	20	62	34	0,8335	0,6592
		Ожид.	22,4	57,2	36,4		
		%	17,2	53,4	29,3		
Кумыки	127	Набл.	21	63	43	0,0661	0,9675
		Ожид.	21,7	61,6	43,7		
		%	16,5	49,6	33,9		
Лезгины	123	Набл.	21	63	39	0,2695	0,8739
		Ожид.	22,4	60,2	40,4		
		%	17,1	51,2	31,7		

Таблица 3. Попарное сравнение частот вариантов rs11385942 G>GA среди аварцев, даргинцев, лакцев, кумыков, лезгинов и русских (точный тест Фишера, p-значение)

Table 3. Pairwise comparison of detection frequency of rs11385942 G>GA marker variants among Avars, Dargins, Laks, Kumyks, Lezgins and Russians (Fisher's exact test, P-value)

Варианты	Группа	N	GA (%)	G (%)	Аварцы	Даргинцы	Лакцы	Кумыки	Лезгины	Русские
rs11385942	Аварцы	118	24 (10,17)	212 (89,83)		0,8819	0,2557	0,1315	1,0000	0,4493
G>GA	Даргинцы	121	26 (10,74)	216 (89,26)		0,3292	0,1777	0,7691	0,3192	
	Лакцы	116	32 (13,79)	200 (86,21)			0,7947	0,2045	0,0255	
	Кумыки	127	25 (9,84)	229 (90,16)				0,1028	0,5394	
	Лезгины	123	37 (15,04)	209 (84,96)					0,0041	
	Русские [15]	508	88 (8,66)	928 (91,34)						

Таблица 4. Попарное сравнение частот вариантов rs657152 A>C среди аварцев, даргинцев, лакцев, кумыков, лезгинов и русских (точный тест Фишера, p-значение)

Table 4. Pairwise comparison of detection frequency of rs657152 A>C marker variants among Avars, Dargins, Laks, Kumyks, Lezgins and Russians (Fisher's exact test, P-value)

Варианты	Группа	N	C (%)	A (%)	Аварцы	Даргинцы	Лакцы	Кумыки	Лезгины	Русские
rs657152	Аварцы	118	125 (52,97)	111 (47,03)		0,6463	0,5171	0,3602	0,2365	0,0673
A>C	Даргинцы	121	134 (55,37)	108 (44,63)		0,9264	0,7151	0,4692	0,2454	
	Лакцы	116	130 (56,03)	102 (43,97)			0,7826	0,5823	0,3369	
	Кумыки	127	149 (58,66)	105 (41,34)				0,7861	0,5630	
	Лезгины	123	141 (57,32)	105 (42,68)					0,8303	
	Русские [15]	508	600 (59,52)	408 (40,48)						

группах попарно между собой и с референтной выборкой русских как наиболее многочисленной этнической группой в России (табл. 3, 4).

Среди изученных групп народов Дагестана распространенность rs11385942 G>GA находится в диапазоне от 10,17% среди аварцев до 15,04% среди лезгинов. Сравнение с частотой носительства аллельного варианта среди русского населения России из данных работы О. Balanovsky и соавт. [15] показало, что значимые различия наблюдаются между русской (8,66%) и лакской (13,79%), между русской и лезгинской (15,04%) группами ($p<0,05$) (рис. 1).

Распределение аллелей полиморфизма rs657152 A>C среди изученных этнических групп Дагестана составляло от 52,97% среди аварцев до 58,66% среди кумыков. При сравнении с частотой

rs657152 A>C среди русских (59,52%) [15] никаких значимых различий выявлено не было (рис. 2).

Обсуждение

GWAS исследование D. Ellinghaus и соавт. [11], проведённое в самом начале пандемии COVID-19 на выборках пациентов из клинических центров в Италии и Испании, выявило ассоциацию в генном кластере в локусе 3p21.31, включающий гены SLC6A20, LZTFL1, CCR9, FYCO1, CXCR6, XCR1: носительство GA аллельного варианта маркера rs11385949 G>GA ассоциировалось с более тяжёлым течением COVID-19 в виде большей частоты развития острой дыхательной недостаточности. Обнаружено, что частота носительства рискового аллеля GA была выше среди пациентов, кто



Рис. 1. Частота аллельных вариантов rs11385942 G>GA среди аварцев, даргинцев, лакцев, кумыков, лезгинов и русских.

Fig. 1. Frequency of allelic variants of rs11385942 G>GA marker among Avars, Dargins, Laks, Kumyks, Lezgins, and Russians.



Рис. 2. Частота аллельных вариантов rs657152 A>C среди аварцев, даргинцев, лакцев, кумыков, лезгинов и русских.

Fig. 2. Frequency of allelic variants of rs657152 A>C marker among Avars, Dargins, Laks, Kumyks, Lezgins, and Russians.

находился на искусственной вентиляции лёгких по сравнению с теми, кто получал только кислородную поддержку [11]. Объяснением такой связи варианта rs11385949 G>GA было, что область вблизи rs11385942 на хромосоме 3p21.31 значительно влияет на экспрессию LZTFL1 ($p<0,05$), гена регулятора ресничек дыхательных путей [16].

Другой важной находкой GWAS анализа D. Ellinghaus и соавт. [11] явился ассоциативный сигнал полиморфизма rs657152 A>C в локусе 9q34.2, совпадший с локусом, кодирующим группы крови АBO. Частота носительства rs657152 A>C была выше у пациентов с COVID-19 и развитием дыхательной недостойности. Обнаружено, что риск развития дыхательной недостаточности при COVID-19 был выше у пациентов с группой крови А (II) по сравнению с другими группами. Тогда как наименьший риск — у пациентов с группой крови О (I). Таким образом, авторы поддерживали тезис о роли группы крови АBO в прогнозе COVID-19. Большое количество исследований свидетельствовали о наличии связи между группой крови АBO и предрасположенностью к COVID-19 [17, 18], однако речь в них в первую очередь шла о риске инфицирования (заражения), который не связан с тяжестью заболевания [6]. Протективный эффект группы О (I), в отличие от других групп крови, объяснялся наличием нейтрализующих антител против белок-связанных N-гликанов (protein-linked N-glycans) [11]. Также известно о связи АBO локуса и экспрессии гена фактора фон Виллебранда (VWF) (локус 12p13.31), который, связываясь с VIII фактором, способствует образованию тромбов на поверхности повреждённых сосудов. Связь варианта

rs657152 A>C группы крови АBO с VWF в качестве фактора риска госпитализации по поводу респираторных инфекций также отмечалась в GWAS-исследовании B. T. Steffen и соавт. [19]. Лёгочные эндотелиальные клетки в не-О-группах ассоциируются с более высокими уровнями VWF по сравнению с группой крови О(I) [20], что также могло объяснить роль АBO локуса в тяжести COVID-19 у пациентов.

Помимо выше упомянутых механизмов, исследователи выделяют связь носительства варианта rs11385949 G>GA и группы крови АBO с уровнем активации каскада комплемента у больных COVID-19. В группе из 72 пациентов, европейского происхождения и не являющихся друг другу родственниками, было показано, что вариант rs11385949 G>GA ассоциировался с повышенной активацией комплемента как C5a, так и терминального каскада комплемента SC5b-9, тогда как у пациентов с не-О(I) группой крови — только с уровнем C5a [21]. Выводы согласуются с данными о роли системы активации комплемента в повреждении лёгких.

Ранее в исследовании O. Balanovsky и соавт. [15] на выборке популяций из России была выявлена положительная корреляция между частотой носительства маркеров rs11385942 G>GA и rs657152 A>C и смертностью от COVID-19, при этом для rs657152 A>C корреляция была особенно сильной ($r=0,59$, $p=0,02$). Вместе с этим, исследователи оговаривали, что такая корреляция релевантна только для российской выборки и не коррелирует при анализе параметров на данных по мировым популяциям.

Эти же маркеры и их корреляция с уровнем вирусной нагрузки и вероятностью заболевания

в славянской популяции Восточной Сибири (Иркутская область) были изучены в работе Е. А. Орловой и соавт. [22], но связи маркеров с тяжестью COVID-19 выявлено не было. Исследователи проанализировали частоту *rs657152 A>C* в когортах 129 больных COVID-19 и 466 здоровых лиц и не обнаружили между ними значимых различий. Различий в распределении частот *rs657152 A>C* между пациентами с высокой и низкой вирусной нагрузкой также выявлено не было, что свидетельствовало о том, что носительство *rs657152 A>C* само по себе не может рассматриваться как фактор риска более тяжёлого течения COVID-19. Схожие противоречивые данные о вкладе рассматриваемых маркеров в тяжесть течения заболевания были получены при исследовании типа случай–контроль в группах пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких (ХОБЛ) ($n=255$) и здоровых контроллях ($n=243$). Не было выявлено различий в тяжести заболевания и выживаемости между больными ХОБЛ и контрольной группой (все p -значения $> 0,01$) как при рассмотрении аллелей риска по отдельности, так и комбинаций аллелей или полигенной оценки риска [23].

В той же работе О. Balanovsky и соавт. [15] были изучены паттерны распределения маркеров *rs11385942 G>GA* и *rs657152 A>C*, ассоциированных с тяжёлым течением COVID-19, в популяциях Евразии: проживающих на территории Беларуси, Украины, регионов центральной России, Северного Кавказа и Закавказья, Поволжья, Казахстана и республик Центральной Азии. Авторами было показано, что переход от высоких к низким частотам *rs11385942 G>GA* по всей Евразии не является резким, а повторяет картину клинических вариаций. Распределение же *rs657152 A>C* было более однородным [15]. В европейской популяции в общем *rs11385942 G>GA* встречается с частотой 7,87%, а *rs657152 A>C* — 62,91%. Логически ожидается, что частота маркеров в отдельных европейских популяциях будет примерно соответствовать, но данные R. Marçalo и соавт. [23] подтверждают обратную тенденцию. На примере выборок из Португалии, Испании и Италии авторами было показано, что все они значимо отличаются от общеевропейской: 5,82, 6 и 10,33%, соответственно, для *rs11385942 G>GA*; 57,86, 62,59 и 61,57%, соответственно, для *rs657152 A>C*. Авторы подчёркивают, что даже на уровне европейских субпопуляций наблюдается высокая генетическая гетерогенность, что требует создания более подробных карт распределения интересующих маркеров.

В нашей работе показано, что среди этнических групп Дагестана *rs657152 A>C* распределён относительно гомогенно, без значимых различий в группах и соотносится с данными по частоте маркера среди русских, в популяциях на европейском и мировом уровне — 50–60%. По *rs11385942 G>GA* распределение рискового маркера *GA* внутри популяций региона относительно гомогенно, но выше по сравнению с русской группой (для лакцев и лезгинов, $p<0,05$). Средняя частота *rs11385942 G>GA* среди кавказских групп опять же выше (10–15%), если сравнивать с данными по европейским популяциям (около 8%). Подобные различия и относительно высокие частоты носительства варианта *rs11385942 G>GA* имеют важное значение в понимании возможных причин эпидемиологических показателей, регистрируемых в том или ином регионе [24].

Заключение

Изучение распределения носительства генетических маркеров чувствительности к заболеваниям на уровне различных этнических субпопуляций в рамках одного государства имеет важное значение для более эффективного контроля над заболеваниями, в том числе с помощью выделения популяций с повышенной чувствительностью к подобным патологиям и разработки регион-специфических мер борьбы и профилактики нозологии. На уровне локальных этнических групп в Дагестане нами было показано, что между собой такие группы не отличаются по носительству обоих изученных маркеров тяжести COVID-19. Вместе с тем, по *rs11385942 G>GA* частота в проанализированных группах в среднем была выше в сравнении с русскими и средним значением для европейских популяций [25].

Дополнительная информация

Информация об источниках финансирования. Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации, тематика 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).

Информация о конфликте интересов. Все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Панель ВОЗ по коронавирусу (COVID-19). URL: <https://covid19.who.int/table> (дата обращения 09.07.2023) [Panel' VOZ po koronavirusu (COVID-19). URL: <https://covid19.who.int/table> (data obrashcheniya 09.07.2023)]
- He F, Deng Y, Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *J Med Virol*. 2020; 92 (7): 719–725. doi: 10.1002/jmv.25766.
- Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395 (10223): 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
- Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. 2020; 8 (5): 475–481. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
- Shahid Z, Kalayanamitra R, McClafferty B, et al. COVID-19 and older adults: what we know. *J Am Geriatr Soc*. 2020; 68 (5): 926–929. doi: 10.1111/jgs.16472.
- Wu Z, McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323 (13): 1239–1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648.
- Phan L.T, Nguyen T.V, Luong Q.C, et al. Importation and human-to-human transmission of a novel coronavirus in Vietnam. *N Engl J Med*. 2020; 382 (9): 872–874. doi: 10.1056/NEJMCo2001272.
- Европейский центр по профилактике и контролю заболеваний. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19-pandemic> (дата обращения 12.07.2023) [Evropejskij tsentr po profilaktike i kontrolju zabolovanij. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19-pandemic> (data obrashcheniya 12.07.2023)]
- Ghasemian R, Shamshirian A, Heydari K, et al. The role of vitamin D in the age of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Pract*. 2021; 75 (11): e14675. doi: 10.1111/ijcp.14675.
- Rhodes J.M, Subramanian S, Laird E, et al. Perspective: Vitamin D deficiency and COVID-19 severity — plausibly linked by latitude, ethnicity, impacts on cytokines, ACE2 and thrombosis. *J Intern Med*. 2021; 289 (1): 97–115. doi: 10.1111/joim.13149.
- Severe Covid-19 GWAS Group; Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with respiratory failure. *N Engl J Med*. 2020; 383 (16): 1522–1534. doi: 10.1056/NEJMoa2020283.
- Мирзаев К.В., Федоринов Д.С., Иващенко Д.В., Сычев Д.А. Мультиэтнический анализ кардиологических фармакогенетических маркеров генома цитохрома P450 и мембранных транспортеров российской популяции. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2019; 15 (3): 393–406. doi: <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2019-15-3-393-406>. [Mirzaev K.B., Fedorinov D.S., Ivaщенко D.V., Sychev D.A. Multi-Ethnic analysis of cardiac pharmacogenetic markers of cytochrome P450 and membrane transporters genes in the Russian population. Rational Pharmacotherapy in Cardiology. 2019; 15 (3): 393–406. doi: <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2019-15-3-393-406>. (in Russian)]
- Мирзаев К.В., Федоринов Д.С., Акмалова К.А. и др. Анализ носительства клинически значимых аллельных вариантов генов TPMT и DPYD, ассоциированных с ответом на лекарственную терапию в онкогематологической практике, среди 9 этнических групп Российской Федерации. Терапевтический архив. 2020; 92 (8): 43–51. doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.08.000719>. [Mirzaev K.B., Fedorinov D.S., Akmalova K.A. et al. Analysis of carrying clinically significant allelic variants of TPMT and DPYD genes associated with the response to drug therapy in cancer practice among 9 ethnic groups of the Russian Federation. Терапевтический архив. 2020; 92 (8): 43–51. doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.08.000719>. (in Russian)]
- Tang H, Quertermous T, Rodriguez B, et al. Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. *Am J Hum Genet*. 2005; 76 (2): 268–275. doi: 10.1086/427888.
- Balanovsky O, Petrushenko V, Mirzaev K, et al. Variation of genomic sites associated with severe Covid-19 across populations: global and national patterns. *Pharmgenomics Pers Med*. 2021; 14: 1391–1402. doi: 10.2147/PGPM.S320609.
- Fink-Baldauf I.M., Stuart W.D., Brewington J.J. et al. CRISPRi links COVID-19 GWAS loci to LZTFL1 and RAVER1. *EBioMedicine*. 2022; 75: 103806. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103806.
- Zhao J, Yang Y, Huang H, et al. Relationship between the ABO blood group and the coronavirus disease 2019 (COVID-19) susceptibility. *Clin Infect Dis*. 2021; 73 (2): 328–331. doi: 10.1093/cid/ciaa1150.
- Zietz M, Zucker J, Tattonetti N.P. Associations between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 5761. doi: 10.1038/s41467-020-19623-x.
- Steffen B.T, Pankow J.S., Lutsey P.L. et al. Proteomic profiling identifies novel proteins for genetic risk of severe COVID-19: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Hum Mol Genet*. 2022; 31 (14): 2452–2461. doi: 10.1093/hmg/ddac024.
- Murray G.P, Post S.R., Post G.R. ABO blood group is a determinant of von Willebrand factor protein levels in human pulmonary endothelial cells. *J Clin Pathol*. 2020; 73 (6): 347–349. doi: 10.1136/jclinpath-2019-206182.
- Valenti L, Griffini S, Lamorte G, et al. Chromosome 3 cluster rs11385942 variant links complement activation with severe COVID-19. *J Autoimmun*. 2021; 117: 102595. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102595.
- Орлова Е.А., Огарков О.Б., Хромова П.А. и др. Вариант rs657152 не ассоциируется с уровнем вирусной нагрузки при COVID-19 или вероятностью заболевания в популяции европеоидов Восточной Сибири. Генетика. 2021; 57 (8): 974–976. doi: <https://doi.org/10.31857/S0016675821080099>. [Orlova E.A., Ogarkov O.B., Khromova P.A. et al. SNP rs657152 Is not associated with the level of viral load in COVID-19 or the probability of disease in the population of caucasians in Eastern Siberia. Russ J Genet. 2021; 57 (8): 982–984]. doi: <https://doi.org/10.31857/S0016675821080099>. (in Russian)]
- Marçalo R, Neto S, Pinheiro M, et al. Evaluation of the genetic risk for COVID-19 outcomes in COPD and differences among worldwide populations. *PLoS One*. 2022; 17 (2): e0264009. doi: 10.1371/journal.pone.0264009.
- Статистика распространения коронавируса в Республике Дагестан. URL: <https://coronavirus-monitor.info/country/russia/respublika-daghestan/> (дата обращения 15.07.2023) [Statistika rasprostraneniya koronavirusa v Respublike Dagestan. URL: <https://coronavirus-monitor.info/country/russia/respublika-daghestan/> (data obrashcheniya 15.07.2023)]
- Национальная библиотека медицинских наук США. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11385942/#frequency_tab (дата обращения 10.08.2023) [Natsional'naya biblioteka meditsinskikh nauk SShA. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11385942/#frequency_tab (data obrashcheniya 10.08.2023)]

Информация об авторах

Абдуллаев Шерзод Пардабаевич — к. б. н., заведующий отделом предиктивных и прогностических биомаркеров научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины, Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9001-1499

Маммаев Камал Магомед-Баговиц — студент Дагестанского государственного медицинского университета, Республика Дагестан, Махачкала, Россия. ORCID ID: 0009-0003-2256-6662

Денисенко Наталья Павловна — к. м. н., заместитель директора научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины; доцент кафедры клинической фармакологии и терапии им. академика Б. Е. Вогчала, Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, Москва, Россия. ORCID ID: /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, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9001-1499

Kamal M.-B. Mammaev — undergraduate student, Dagestan State Medical University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russia. ORCID ID: 0009-0003-2256-6662

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, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3278-5941

Темирбулатов Ильяс Ильдарович — аспирант кафедры клинической фармакологии и терапии им. академика Б. Е. Вотчала, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1242-0833

Качанова Анастасия Алексеевна — младший научный сотрудник отдела предиктивных и прогностических биомаркеров научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3194-4410

Михайлена Елизавета Вячеславовна — аспирант кафедры фармакологии, Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6175-8179

Крюков Александр Валерьевич — к. м. н., доцент кафедры клинической фармакологии и терапии им. академика Б. Е. Вотчала, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7903-2977

Валиев Тимур Таймуразович — д. м. н., доцент, профессор кафедры детской онкологии им. академика Л. А. Дурнова, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1469-2365

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

Маммаев Сулейман Нураттинович — д. м. н., профессор, профессор кафедры Госпитальной терапии № 1, Дагестанский государственный медицинский университет, Республика Дагестан, Махачкала, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8898-8831

Сычев Дмитрий Алексеевич — д. м. н., профессор, академик РАН, ректор; заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии им. академика Б. Е. Вотчала, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-4496-3680

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, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1242-0833

Anastasia A. Kachanova — junior researcher, Department of Predictive and Prognostic Biomarkers of the Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3194-4410

Elizaveta V. Mikhaylenko — postgraduate student, Department of Pharmacology, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6175-8179

Alexander V. Kryukov — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Therapy named after Academician B. E. Votchal, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7903-2977

Timur T. Valiev — D. Sc. in Medicine, Associate Professor, Professor of the Department of Pediatric Oncology named after Academician L. A. Durnov, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1469-2365

Karin B. Mirzaev — D. 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, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9307-4994

Suleiman N. Mammaev — D. Sc. in Medicine, Professor, Professor of the Department of Hospital Therapy No. 1, Dagestan State Medical University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8898-8831

Dmitry A. Sychev — D. Sc. in Medicine, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Rector; Head of the Department of Clinical Pharmacology and Therapy named after Academician B. E. Votchal, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-4496-3680

Купирование токсических эффектов кислорода сукцинатами у пациентов с COVID-19 при высокопоточной оксигенотерапии

Н. В. ГОВОРОВА¹, С. В. ЦИЛИНА², И. А. ХИЛЕНКО², В. В. РЕЗВЫХ¹, *Ю. П. ОРЛОВ¹

¹ ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет Минздрава России, Омск, Россия

² Бюджетное Учреждение Здравоохранения Омской области Городская клиническая больница № 11, Омск, Россия

Relief from Toxic Effects of Oxygen Using Succinates in Patients with COVID-19 Undergoing High-Flow Oxygen Therapy

NATALY V. GOVOROVA¹, SVETLANA V. TSILINA¹, IRINA A. KHILENKO²,
VIKTOR V. REZVYKH¹, *YURII P. ORLOV¹

¹ Omsk State Medical University, Omsk, Russia

² City Hospital No. 11, Omsk, Russia [Omsk Region City Clinical Hospital No. 11]

Резюме

Либеральная кислородная терапия при COVID-19 вызывает гипероксемию у большинства пациентов и снижает их выживаемость. Даже умеренная гипероксемия снижает доставку кислорода, а высокие уровни кислорода в центральной венозной крови увеличивают смертность у пациентов с COVID-19. Указанные факты обусловлены проявлением токсических эффектов кислорода (вазоконстрикция, бронхоконстрикция), требующих использования медикаментов, снижающих токсические эффекты. Цель исследования: оценить возможность устранения препаратами сукцинатов токсических эффектов кислорода, влияющих на центральную гемодинамику и показатели оксигенации крови у пациентов с COVID-19. *Материал и методы.* В ретроспективном исследовании 51 выжившего пациента с новой коронавирусной инфекцией, получавших высокопоточную оксигенотерапию (ВПО), проанализирован эффект препаратов, содержащих сукцинаты (Цитофлавин и Реамберин), по купированию проявлений гипероксии. *Результаты.* Мониторинг ЧСС, ЧДД, SpO₂, PaO₂ и PaO₂/FiO₂ в процессе проведения ВПО в течение 12 ч от начала оксигенотерапии показал косвенный, но статистически достоверный эффект купирования токсических эффектов кислорода. Это выражалось в уменьшение тахикардии и тахипноэ [до 86,7–115,0 (при $P<0,001$) и 22–24 ($P<0,001$)], соответственно, на фоне вводимых параллельно препаратов сукцинатов, которые обеспечивали эффективное усвоение кислорода и способствовали эффективному устранению гипоксии и гипероксемии (увеличение PaO₂/FiO₂ до 196,0 [(184,2–249,0) при $P<0,001$], что подтверждалось динамичным снижением уровня лактата (до 2,6±0,8 ммоль/л при $P<0,001$). *Заключение.* Полученные результаты косвенно подтверждают защитный эффект сукцинатов, более выраженный у Цитофлавина, но требуют дополнительного подтверждения гипотезы эффективности использования сукцинатов для купирования токсических эффектов кислорода в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: COVID-19; гипоксия; гипероксия; сукцинаты

Для цитирования: Говорова Н. В., Цилина С. В., Хиленко И. А., Резвых В. В., Орлов Ю. П. Купирование токсических эффектов кислорода сукцинатами у пациентов с COVID-19 при высокопоточной оксигенотерапии. Антибиотики и химиотер. 2023; 68: 7–8: 42–52. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-42-52>.

Abstract

Liberal oxygen therapy for COVID-19 causes hyperoxemia in most patients and reduces their survival rate. Even moderate hyperoxemia reduces oxygen delivery, and high levels of oxygen in central venous blood increase mortality in COVID-19 patients. These facts occur due to the manifestation of toxic effects of oxygen (vasoconstriction, bronchoconstriction) requiring the use of medications that reduce toxic effects. The aim of the study was to assess the ability of succinate preparations to eliminate the toxic effects of oxygen affecting central hemodynamics and blood oxygenation in patients with COVID-19. *Material and methods.* The effect of medicines containing succinates (Cytoflavin and Reamberin) in stopping the manifestations of hyperoxia in 51 surviving patients with the novel coronavirus infection who received high-flow oxygen therapy (HFOT) was analyzed in a retrospective study. *Results.* Monitoring of heart rate, respiratory rate, SpO₂, PaO₂ and PaO₂/FiO₂ during HFOT within 12 hours from the start of oxygen therapy showed an indirect, but statistically significant effect of stopping the toxic effects of oxygen. This was expressed in a decrease in tachycardia and tachypnea [to 86.7–115.0 (at $P<0.001$) and 22–24 ($P<0.001$), respectively] against the background of concomitantly administered succinate preparations, that provided effective oxygen absorption and contributed to the effective elimination of hypoxia and hypoxemia (an increase in PaO₂/FiO₂ to 196.0 [(184.2–249.0) at $P<0.001$], which was confirmed by a dynamic decrease in the level of

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Ленина, д. 12, Омский ГМУ, Россия, 644099. E-mail: orlov-up@mail.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 12 Lenin str., Omsk State Medical University, Omsk, 644099 Russia. E-mail: orlov-up@mail.ru

lactate (to 2.6 ± 0.8 mmol/l at $P < 0.001$). **Conclusion.** The results obtained indirectly confirm the protective effect of succinates, which are more pronounced in Citoflavin, but require additional confirmation of the hypothesis of succinate effectiveness in stopping the toxic effects of oxygen in further studies.

Keywords: COVID-19; hypoxia; hyperoxia; succinates

For citation: Govorova N. V., Tsilina S. V., Khilenko I. A., Rezvykh V. V., Orlov Yu. P. Relief from toxic effects of oxygen using succinates in patients with COVID-19 undergoing high-flow oxygen therapy. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 7–8: 42–52. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-42-52>.

Введение

Проблемы, связанные с токсичностью кислорода в реанимации, были отмечены ещё в 1960-х годах, когда описывался «респираторно-лёгочный синдром», наблюдаемый у пациентов с искусственной вентиляцией лёгких, подвергшихся воздействию высоких концентраций кислорода [1]. Тем не менее, терапевтическое окно для дополнительной кислородотерапии, оптимальная доза, как и способ доставки кислорода, до сих пор остаются значительным научным пробелом в контексте различных рекомендаций международных обществ интенсивной терапии [2].

Общей чертой большинства пациентов, поступавших с коронавирусной болезнью в период 2019–2022 гг. (COVID-19), являлось наличие пневмонии (пневмонит), протекавшей с симптомами поражения нижних дыхательных путей, что приводило к гипоксемической дыхательной недостаточности с высокой потребностью в дополнительном кислороде [3]. Добавление кислорода в том или ином варианте являлось спасительным методом в комплексе лечения COVID-19, но, как показывают многие публикации, также гипероксия была связана и с побочными эффектами [4].

Сегодня растёт понимание того, что кислород, помимо незначительных побочных эффектов, таких как сухость слизистой оболочки дыхательных путей, гипероксия, также представляет риски из-за образования активных форм кислорода (АФК), проявлений лёгочной токсичности, сужения коронарных и церебральных сосудов, что во многих случаях усугубляло как тяжесть общего состояния пациентов, так и исход заболевания [5]. Что касается лёгочной токсичности кислорода, то она известна с тех пор, как была продемонстрирована на мышной модели Лоррейном Смитом ещё в 1899 г. [6]. Недавно метаанализ 25 рандомизированных контролируемых исследований с участием 16037 остро больных пациентов, госпитализированных в больницу, показал повышенную летальность, связанную с либеральным кислородным лечением, по сравнению с консервативной кислородной тактикой [7].

Но в доступной литературе есть и совершенно противоположные данные. Так, исследование 152000 пациентов, находящихся в условиях ИВЛ, не выявило связи между гипероксией и

смертностью в течение первых 24 ч в отделении интенсивной терапии, [8], а другое исследование, проведённое на 14000 пациентов отделения интенсивной терапии, показало, что PaO_2 около 135 мм рт. ст. приводит к наименьшему уровню летальности [9]. Наконец, недавнее исследование рандомизировало 2928 пациентов отделения интенсивной терапии с низким или высоким целевым артериальным давлением кислорода (определенным как 60 против 90 мм рт. ст.) в течение максимум 90 дней и не обнаружило различий в летальности [10]. Таким образом, нормоксемия сегодня представляет собой хрупкую «золотую середину» между двумя состояниями, из которых мы знаем, что одно из них (гипоксия) вредно, и опасаемся, что другое (гипероксия) также может быть вредно.

Тем не менее, вопрос о том, может ли популяция пациентов с COVID-19 получить пользу от более строгого подхода к дополнительной кислородной терапии, чем это рекомендовано действующими российскими рекомендациями [11], представляет собой большой и важный интерес.

Постоянный приток кислорода необходим для жизнеспособности и функционирования сердца. Однако роль кислорода и связанных с кислородом процессов в сердце сложна, и они могут быть либо полезными, либо способствовать сердечной дисфункции и смерти. Поскольку кислород является основным фактором, определяющим экспрессию сердечных генов, и критически важным участником образования АФК и многих других клеточных процессов, то рассмотрение отрицательного влияния кислорода на центральную гемодинамику имеет важное значение для понимания патогенеза сердечной дисфункции. Тахикардия, как известно, регистрируемая уже через 1 ч после начала высокопоточной оксигенотерапии (ВПО), связана с токсическими эффектами кислорода, за счёт синтеза АФК [12], оказывающих влияние и на сердечно-сосудистую систему за счёт вазоконстрикции лёгочных капилляров, повышения их проницаемости, увеличение воды в лёгких, а также бронхоспазма за счёт вымывания оксида азота (NO), снижения транспорта мокроты и развития обструкции [13]. Более того, гипероксия также может привести к снижению сердечного выброса [14] коронарного кровотока и потребления кислорода миокардом

за счёт вазоконстрикции [15] и вызывать повреждения, опосредованные свободными радикалами в различных органах [16].

Цель исследования — оценить возможность устранения препаратами сукцинатов токсических эффектов кислорода, влияющих на центральную гемодинамику и показатели оксигенации крови у пациентов с COVID-19.

Материал и методы

В ретроспективное исследование были включены данные историй болезни выжившего 51 пациента с новой коронавирусной инфекцией, проходивших лечение в отделении реанимации и интенсивной терапии в период 2020–2021 гг. Исследуемые были разделены на 2 группы. Первая (I) группа — пациенты ($n=17$) с новой коронавирусной инфекцией среднетяжёлого или тяжёлого течения, получавшие кислород в виде ВПО с потоком 20–40 л/мин при FiO_2 30–60% без использования в программе интенсивной терапии препаратов, содержащих сукцинаты. Вторая (II) группа — пациенты ($n=34$) с новой коронавирусной инфекцией среднетяжёлого или тяжёлого течения, получавшие кислород аналогичным методом (20–40 л/мин при FiO_2 30–60%), но с использованием в программе интенсивной терапии препаратов, содержащих сукцинаты (цитофлавин или реамберин). Цитофлавин вводили из расчёта 0,25 мг/кг/ч в расчёте на сукцинат, 1,5% раствор реамберина вводили в виде длительной инфузии (3–4 ч) из расчёта 0,3–1,5 мг/кг/мин.

ВПО проводили с помощью увлажнителя с интегрированным генератором потока Airo2 (PT101) с возможностью проградиентной регуляции скорости потока газа и его температуры, точной установки содержания кислорода во вдыхаемой смеси. Основными регулируемыми параметрами используемого аппарата являются скорость потока газа (от 10 до 60 л/мин), стартовая скорость потока (10–40 л/мин), различная величина подаваемого уровня FiO_2 (21–100%), достаточная для обеспечения адекватных PaO_2 и сатурации кислорода, а также возможность регуляции температуры воздушно-газовой смеси (от 35 до 38°C).

В обеих группах тактика оксигенотерапии заключалась в пошаговом увеличении концентрации кислорода при стартовой концентрации — FiO_2 30%. При отсутствии эффекта ($\text{SaO}_2 < 90\%$) через 1 ч — увеличивали FiO_2 до 40%. Через 2 ч при отсутствии эффекта — увеличивали FiO_2 до 50%, и через 3 ч при отсутствии эффекта — FiO_2 увеличивали до 60%. Критериями прекращения оксигенотерапии являлась: возможность перевода пациента на низкоточечную оксигенотерапию (при скорости потока газа менее 20 л/мин и FiO_2 менее 40%), удовлетворительные показатели газов крови (PaO_2 90 мм рт. ст. и $\text{SaO}_2 > 90\%$). При этом максимальный поток кислорода не превышал 60 л/мин.

Оценка тяжести общего состояния и базовая терапия всех пациентов проводилась с учётом рекомендаций Общероссийской общественной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов» по упрощённой шкале оценки острых функциональных изменений SAPS II (Simplifi ed Acute Physiology Score) и по шкале NEWS (National EarlyWarning Score) [17]. Всем пациентам проводили стандартные лабораторные исследования. Определение газов крови осуществляли на автоматическом анализаторе ABL815 Flex (Radiometer, Дания). Уровень гликемии измеряли глюкозооксидазным методом. Лактат венозной крови определяли с помощью биохимического анализатора StatFax 1904+ (Awareness Technology, США).

Критерий включения: возраст 18–45 лет; пациенты с новой коронавирусной инфекцией среднетяжёлого или тяжёлого течения (наличие подтверждённой на КТ инфильтрации лёгочной ткани (КТ — 1, 2, 3) + 2 и более признаков (лихорадка

более 38,5°C, ЧДД более 30 в минуту, SaO_2 менее 90% (при дыхании атмосферным воздухом), обязательного последующего подтверждения наличия РНК SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции; длительность от начала заболевания до 5 сут; первичное поступление в отделение реанимации или перевод в отделение реанимации из линейного отделения (не более 24 ч назад); отсутствие на момент включения, а также на протяжении всего исследования тяжёлых сопутствующих терапевтических, иммунологических и хирургических заболеваний и/или осложнений, беременности, концентрация общего гемоглобина не более 150 г/л и не менее 110 г/л.

Критерии исключения: пациенты в терминальной стадии неизлечимых заболеваний; тяжёлый неврологический дефицит (по шкале комы Глазго ≤ 8); первичный и/или вторичный иммунодефицит (в случае ВИЧ-инфекции — без антиретровирусной терапии); длительный приём кортикоステроидов; беременность; тяжёлое хроническое заболевание лёгких; исходно хроническое интерстициальное заболевание лёгких с постоянной интерстициальной инфильтрацией на рентгенограмме; документированная хроническая задержка $\text{CO}_2 > 50$ мм рт. ст. и/или хроническая гипоксемия ($\text{PaO}_2 < 55$ мм рт. ст., $\text{FiO}_2 = 0,21$); хронические рестриктивные, обструктивные, нервно-мышечные заболевания, заболевания грудной стенки или лёгочных вспомогательных мышц; морбидное ожирение; проведение искусственной вентиляции лёгких на протяжении последних 6 мес.; вакцинация от гриппа в последние 6 мес.; наличие тяжёлых эндокринных заболеваний, в том числе сахарный диабет I и II типов; концентрация общего гемоглобина более 150 г/л и менее 110 г/л, тяжёлый физический труд, профессиональный спорт, профессиональные вредности.

Оценку эффективности использования сукцинатов для уменьшения степени токсичности кислорода оценивали по изменению параметров ЧСС, ЧДД, SaO_2 , pO_2 , которые оценивались по данным листов интенсивного наблюдения на момент поступления в ОРИТ и в интервале через 3, 6, 12 ч в зависимости от концентрации подаваемого кислорода на фоне проводимой терапии. Индекс оксигенации (индекс Горовица), определяли по формуле $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (Oxygenation index calculated with the $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio). В дальнейшем, для определения преимущества используемых препаратов, группа пациентов, получавших сукцинаты, была разделена на подгруппы, Π_1 получавшие Цитофлавин ($n=18$) и подгруппа Π_2 ($n=16$), где с целью купирования токсических эффектов кислорода использовали Реамберин.

Количественные показатели оценивались статистически на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова–Смирнова (при числе исследуемых более 50). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок (медианы M_e и нижнего и верхнего квартилей $Q1$ – $Q3$). Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U -критерия Манна–Уитни. При сравнении трёх и более зависимых совокупностей, распределение которых отличалось от нормального, использовался непараметрический критерий Фридмана с апостериорными сравнениями с помощью критерия Коновера–Имана с поправкой Холма.

Конечной точкой исследования являлась необходимость/или отсутствие в проведении интубации по истечении 3, 6 и 12 ч оксигенотерапии.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, исследуемые группы были репрезентативными по тяжести общего состояния, стартовым параметрам гемодинамики (тенденция к гипотензии и тахикардии) и рас-

Таблица 1. Сравнительные исходные показатели пациентов при поступлении в ОРИТ
Table 1. Comparative baseline parameters of patients upon admission to the ICU

Показатели	Группа I (n=17)	Группа II (n=34)	p
Возраст	26,4 [19,3–38,1]	29,4 [31,2–36,4]	0,766
SAPS II	9,0 [8,0–10,0]	8,0 [8,0–10,5]	0,812
Шкала NEWS	5,2 [4–6]	5,5 [4–6]	0,881
FiO ₂ , %	54 (50–60)	54 (48–60)	1,0
SaO ₂ , %	86 [86,3–88,2]	87 [84,3–87,2]	0,645
SvO ₂	61 (52–66)	62 (52–67)	0,855
ЧДД, мин	30 [28–34]	30 [28–32]	0,903
АДс мм рт. ст.	70 [59–75]	72 [60–78]	1,0
ЧСС, мин	134 [146–152]	138 [138–144]	0,890
PaO ₂ , мм рт. ст.	56 [54–61]	54 [53–60]	0,940
PaCO ₂	53,70 [48,5–59,8]	54,15 [50,3–59,3]	0,690
PaO ₂ /FiO ₂	99,00 [90,2–110,0]	103,0 [91,6–114,3]	0,892
Лактат, ммоль/л	2,2 [1,9–2,7]	2,3 [2,1–2,8]	0,910
Глюкоза, ммоль/л	7,90 [6,47–9,65]	8,80 [6,40–10,50]	0,789
ИМТ, кг/м ²	28,5 [27,7–31,95]	30,0 [25,7–33,1]	0,484
Поток, л/мин	18 [16–22]	19 [15–20]	0,890

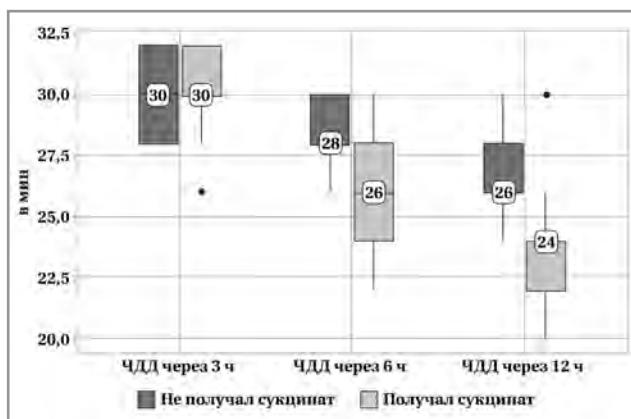


Рис. 1. Динамика ЧДД у пациентов в зависимости от проводимой терапии.

Примечание. Статистически значимые изменения ($p<0,001$); используемый метод: критерий Фридмана.
Fig. 1. Dynamics of respiratory rate in patients depending on the therapy performed.

Note. Statistically significant changes ($P<0.001$); method used: Friedman test.

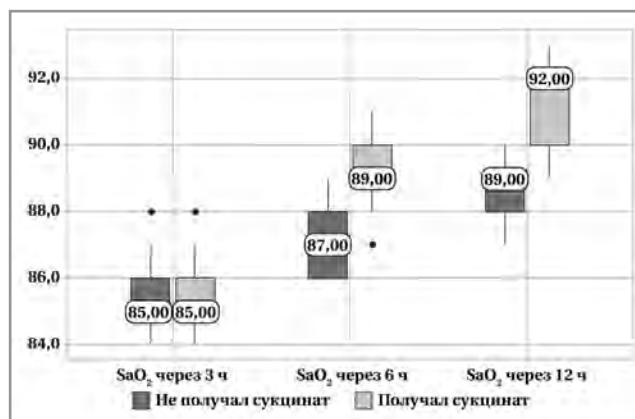


Рис. 2. Анализ динамики SaO₂ в зависимости от проводимой терапии.

Примечание. Статистически значимые изменения ($p<0,001$); используемый метод: критерий Фридмана.
Fig. 2. Analysis of the dynamics of SaO₂ depending on the therapy performed.

Note. Statistically significant changes ($P<0.001$); (method used: Friedman test).

структурм функции дыхания, которая оценивалась по частоте дыхательных движений (тахипноэ), уровню напряжения кислорода в артериальной крови, показателю сатурации артериальной крови и по рассчитанному респираторному индексу. Показатели функции дыхания соответствовали тяжёлой гипоксической дыхательной недостаточности (гипоксемия и гиперкапния), что являлось показанием для инсуфляции дополнительного кислорода.

Оксигенотерапию при потоке кислорода 20–40 литров в минуту (что соответствует 30–60% концентрации кислорода) начинали при поступлении и диагностики гипоксической дыхательной недостаточности под контролем ЧСС, ЧДД, SpO₂, PaO₂ и PaO₂/FiO₂.

При проведении ретроспективной оценки ЧДД (рис. 1), в зависимости от проводимой коррекции гипероксии, эффективность сукцинатов отмечалась уже через 6 ч, что сопровождалось достоверным снижением частоты дыхания и стойким эффектом к 12 ч лечения.

При ретроспективной оценке динамики показателя SaO₂ (рис. 2) в первые 3 ч проводимой терапии не отмечалось статистически значимых изменений между данными сравниваемых групп. Но в период с 6 ч проводимой терапии отмечалась положительная динамика в группе пациентов, получавших для коррекции гипероксии сукцинаты, что позволило уже через 12 ч завершить проведение ВПО при значении SaO₂ 92% [(95% ДИ 90–92) при $p<0,001$].

При анализе показателя «ЧСС ч/з 3 ч» в зависимости от метода лечения, не удалось установить статистически значимых различий между группами ($p=0,160$) (используемый метод *U*-критерий Манна–Уитни). Однако уже через 6 ч высокопоточной оксигенотерапии в группе пациентов, получавших сукцинаты, были отмечены статистически значимые изменения ЧСС ($p=0,010$) (используемый метод: *t*-критерий Уэлча), отраженные на рис. 3.

Дальнейший анализ ЧСС статистически достоверно прогрессировал в интервале 12 ч проводимого лечения с динамичным уменьшением тахикардии, в отличие от пациентов, не получавших сукцинат, что отражено на рис. 4, где отмечается существенное снижение ЧСС в зависимости от вариантов проводимой терапии. Сохранение тахикардии у пациентов I группы в период 12 ч проводимой ВПО, по всей видимости, связано с уменьшением сердечного выброса на фоне поддержания вазоконстрикции коронарных артерий.

Мониторинг купирования гипоксемии (табл. 2) по уровню PaO_2 , проводимый в течение наблюдаемого периода показал, что в 3-часовом интервале отмечались статистически достоверные отличия между группами пациентов, где у пациентов I группы преобладала гипероксия на фоне ВПО. В последующие временные интервалы сохранялась достоверная статистическая значимость — явления гипоксемии у пациентов II группы, были устранены в период 6-часового проведения терапии [62 ± 3 мм рт. ст., (95% ДИ 61–63 при $p<0,001$)] с дальнейшей положительной динамикой к 12 ч наблюдения [69 ± 4 мм рт. ст., (95% ДИ 67–70 при $p<0,001$)]. Это явилось еще одним критерием, наряду с SaO_2 , что позволило через 12 ч завершить проведение ВПО и избежать интубации трахеи у всех пациентов II группы, которые достигли положительной динамики, по данным индекса $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, в диапазоне 196,0 (184,2–249,0) при $p<0,001$ к 12 ч проведения ВПО, в противоположность к данным I группы, где явления острой гипоксемической дыхательной недостаточности

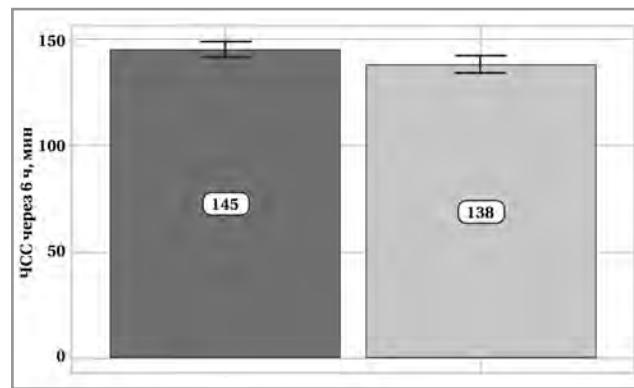


Рис. 3. Анализ показателя «ЧСС ч/з 6 ч» в зависимости от проводимой терапии ($p=0,01$) (используемый метод — *t*-критерий Уэлча).

Fig. 3. Analysis of the «heart rate after 6 hours» indicator depending on the therapy ($P=0,01$) (method used — Welch's *t*-test).

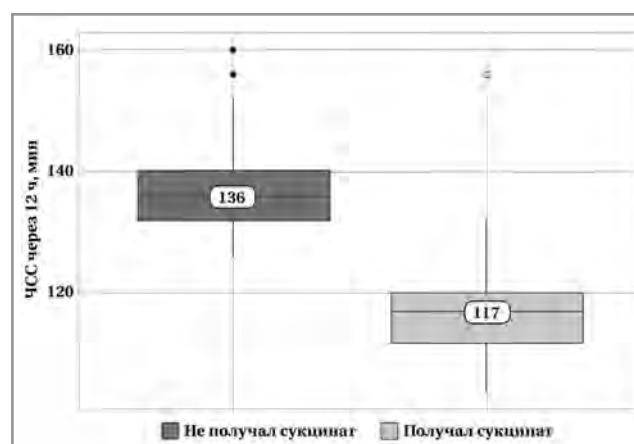


Рис. 4. Анализ показателя «ЧСС ч/з 12 ч» в зависимости от проводимой терапии.

Примечание. Существенные различия ($p<0,001$) (используемый метод — *U*-критерий Манна–Уитни).

Fig. 4. Analysis of the «heart rate after 12 hours» indicator depending on the therapy performed.

Note. Significant differences ($P<0.001$) (method used — Mann–Whitney *U*-test).

Таблица 2. Динамика PaO_2 (мм рт. ст.) и SvO_2 (%) в зависимости от методов лечения
Table 2. Dynamics of PaO_2 (mm Hg) and SvO_2 (%) depending on treatment methods

Группы	PaO_2 мм рт. ст. через 3 ч		SvO_2 % через 3 ч		p
	$M\pm SD$	95% ДИ	$M\pm SD$	95% ДИ	
I	177±22	185–65	56±6	50–58	0,003*
II	52±5	50–54	68±5	62–70	
PaO_2 мм рт. ст. через 6 ч		SvO_2 % через 6 ч			
I	166±32	144–188	58±4	52–64	<0,001*
II	62±3	61–63	70±2	68–74	
PaO_2 мм рт. ст. через 12 часов		SvO_2 % через 12 ч			
I	172±38	181–201	72±4	68–74	<0,001*
II	69±4	67–70	62±4	58–64	

Примечание. * — $p<0,001$; используемый метод — *t*-критерий Стьюдента

Note. * — $P<0.001$; method used — Student's *t*-test

Таблица 3. Динамика напряжения PaCO_2 в зависимости от методов лечения
Table 3. Dynamics of PaO_2 pressure depending on treatment methods

Группы	PaCO_2 мм рт. ст. через 3 ч			<i>p</i>
	$M \pm SD$	95% ДИ	<i>n</i>	
I	53,4±4,2	(49,9–60,0)	17	0,349
II	52,20±3,8	(49,0–55,2)	34	
PaCO_2 мм рт. ст. через 6 ч				
I	54,15±3,6	(50,3–59,3)	17	<0,04*
II	49,45±3,3	(46,4–52,1)	34	
PaCO_2 мм рт. ст. через 12 ч				
I	54,45±3,2	(49,0–55,8)	17	<0,001*, #
II	47,30±3,7	(42,8–49,5)	34	

Примечание.* — статистическая значимость отличий относительно исходных значений; # — статистическая значимость отличий относительно сравниваемых групп.

Note.* — statistical significance of differences relative to the initial values; # — statistical significance of differences relative to the compared groups.

Таблица 4. Изменение концентрации лактата, отражающего эффективность/неэффективность высокопоточной оксигенотерапии

Группы	Лактат через 3 ч			<i>p</i>
	$M \pm SD$	95% ДИ	<i>n</i>	
II	2,4±0,9	[2,2–2,4]	17	0,233
II	2,3±0,7	[2,1–2,4]	34	
Лактат через 6 ч				
I	1,8±0,3	[1,6–1,9]	17	<0,001*
II	2,4±0,3	[2,1–2,5]	34	
Лактат через 12 ч				
I	1,4±0,3	[4,2–5,5]	17	<0,001*
II	2,1±0,4	[2,2–2,4]	34	

Примечание.* — $p<0,001$ при сравнении с исходными данными, используемый метод — *t*-критерий Стьюдента.

Note.* — $P<0,001$ when compared with the original data, method used — Student's *t*-test

сохранялись, по данным индекса $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, на уровне 104,0 (86,7–115,0) при $p<0,001$ на фоне гипероксии 172±38 при 95% доверительном интервале [181–201] и низкой сатурации венозной крови, отражающей уровень гипоксии тканей.

В первой же группе пациентов явления гипероксии и гипоксемии сохранялись на фоне ВПО, что сопровождалось сохранением тахипноэ и тахикардии в течение всего периода исследования, что в общей совокупности потребовало проведение интубации трахеи и перевода на ИВЛ у 5 (29,3%) пациентов в период после 12 ч проведения ВПО.

Коррекция исходной умеренной гиперкапнии (табл. 3) произошла у больных II группы к 6-му часу проведения ВПО, а в группе I гиперкапния на фоне умеренной одышки сохранялась по истечении 12 ч проведения оксигенотерапии.

Комбинированное применение сукцинатов и ВПО, как терапевтических средств, увеличивало потребление O_2 и потенцировало положительное влияние на кислотно-щелочной статус.

Как видно из табл. 4, динамичное снижение уровня лактата к 12 ч проводимой ВПО является доказательством эффективного восстановления кислотно-щелочного баланса за счёт увеличения

эффективности использования кислорода клетками, увеличения активности ферментов биологического окисления и, в первую очередь, сукцинатдегидрогеназы, окисляющей сукцинат в структуре дыхательной цепи. Это, в целом, восстанавливает привычный механизм окислительного фосфорилирования на уровне митохондрий для синтеза АТФ, что согласуется с данными экспериментальных исследований [18, 19].

Для определения преимущества того или иного препарата в эффективности устранения токсических эффектов кислорода нами был проведён анализ влияния Цитофлавина и Реамберина на основные контролируемые показатели, отраженные в табл. 5.

Как видно из данных приведённых в табл. 5, определённые преимущества в купировании токсических эффектов кислорода отмечались при использовании Цитофлавина, что выражалось в более эффективном росте PaO_2 ($p<0,004$), уменьшении частоты тахипноэ ($p<0,02$), купировании лактата ($p<0,002$) и гипергликемии (при $p<0,004$) и способствовало более динамичному снижению используемого уровня $\text{FiO}_2\%$ ($p<0,003$) к 12 ч проводимой ВПО. Преимущества Реамберина выражалось в более эффективном устранении тахи-

Таблица 5. Сравнительные результаты используемых сукцинатов (M±SD)**Table 5. Comparative results of the succinates used (M±SD)**

Показатели	Группа II ₁ (n=18) Цитофлавин			Группа II ₂ (n=16) Реамберин			<i>p</i>
	через 3 ч	через 6 ч	через 12 ч	через 3 ч	через 6 ч	через 12 ч	
FiO ₂ , %	56,4±5,4	48,2±4,4	35,5±3,8	55,7±4,9	51,3±4,3	46,3±4,4	0,003*
SaO ₂ , %	86,4±2,3	89,4±1,2	93,2±2,7	86,2±2,2	89,2±3,2	93,2±2,3	0,678
SvO ₂	66,4±4,1	69,4±4,2	73,1±3,7	62,2±3,4	70,4±3,3	73,2±3,3	0,979
ЧДД, в мин	28,4±3,3	24,4±2,4	20,2±1,8	28,8±3,7	25,1±2,7	22,7±2,2	0,02*
ЧСС, в мин	122±8,3	119±6,6	108±8,3	124±4,7	117±5,5	92±4,8	0,003*
PaO ₂ , мм рт. ст.	60,5±4,4	64,2±3,8	68,7±4,0	60,7±3,9	62,4±4,8	64±3,7	0,004*
PaCO ₂ , мм рт. ст.	51,3±4,4	48,3±3,9	46,2±4,1	53,2±3,3	47,4±4,2	45,5±4,2	0,467
PaO ₂ /FiO ₂	168,3±24,2	170,8±20,1	210,2±5,5	170,4±24,7	178,5±25,4	223,4±26,8	0,002*
Лактат, ммоль/л	2,2±0,4	1,8±0,4	1,6±0,3	2,1±0,5	2,1±0,5	2,1±0,7	0,002*
Глюкоза, ммоль/л	7,1±0,9	6,5±1,1	5,5±0,7	7,2±0,7	6,9±0,9	6,2±0,7	0,004*

Примечание.* — в групповом сравнении на 12 ч проводимой ВПО-терапии, используемый метод — *t*-критерий Стьюдента.

Note.* — in a group comparison for 12 hours of HFOT therapy, method used — Student's *t*-test

кардии ($p<0,003$). Анализ динамики показателей pH крови, SaO₂% и PaCO₂ под влиянием Цитофлавина и Реамберина достоверных статистических изменений не выявил.

Обсуждение

Использование высоких концентраций кислорода в ОРИТ, безусловно, частая ситуация, продиктованная необходимостью коррекции гипоксической дыхательной недостаточности. Но недавние исследования показали, что большая часть тяжелобольных пациентов, часто подвергается ненужным и длительным периодам гипероксии [4].

Как гипоксия, так и гипероксия могут способствовать изменениям гемодинамики у пациентов с лёгочными заболеваниями. Гипоксия, как известно, увеличивает частоту сердечных сокращений за счёт симпатической стимуляции и снижает системное сосудистое сопротивление за счёт тканевого и эндотелиального высвобождения сосудорасширяющих метаболитов. В отличие от периферического кровообращения, гипоксия вызывает сужение сосудов лёгких, опосредованное митохондриями, чувствительными к низкому напряжению кислорода в гладкомышечных клетках лёгочной артерии. Хотя гипоксическая вазоконстрикция лёгких развила для оптимизации вентиляционно-перфузионного соответствия, она может стать крайне нежелательной при таких синдромах, как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), приводя к увеличению постнагрузки на правый желудочек и, как следствие, к правожелудочковой недостаточности.

Гипероксия также связана с несколькими заметными системными эффектами. Как следует из данных обзоров [20, 21], гипероксия вызывает сужение сосудов во многих органах со средним увеличением системного сосудистого сопротивления на 250–550 дин/с/см⁻⁵ и сниже-

нием кровотока в коронарной, мозговой, лёгочной сосудистых системах на 10–30%, главным образом, за счёт снижения выработки и биодоступности оксида азота из-за избыточной выработки АФК.

Токсические эффекты кислорода по отношению к сердечной деятельности описаны уже давно. Сегодня, по данным многочисленных исследований, ясно, что острая гипероксия вызывает вазоконстрикцию, уменьшая при этом локальный кровоток [20], особенно в церебральной и коронарной сосудистой сети [21]. Это вазоконстрикция частично связана со снижением высвобождения оксида азота (NO) из связывания S-нитрозогемоглобина [22]. Вазоконстрикция была показана у пациентов с ишемической болезнью сердца и без неё, где дополнительный O₂ снижал сердечный выброс и кровоток в коронарном синусе [23], что клинически выражалось в потенцировании тахикардии и отсутствии влияния на частоту дыхательных движений. По сравнению с дыханием комнатным воздухом, дыхание 100% кислородом быстро снижало скорость коронарного кровотока на 20% и повышало коронарное сопротивление на 23% без существенного изменения диаметра ёмкостных артерий. Это свидетельствует о том, что острый окислительный стресс вызывает быстрые и существенные изменения коронарного сопротивления и кровотока усугубляя тяжесть дыхательной недостаточности в клинических условиях у пациентов с COVID-19 [23].

Снижение ЧСС у пациентов, получавших ВПО на фоне сукцинатов, по всей видимости, связано с уменьшением выработки АФК, продуцируемых как при гипоксии, так и при гипероксии. Тахипноэ, на фоне гипоксической дыхательной недостаточности, сопровождается увеличением ЧСС, индуцируемой АФК, а поступление сукцинатов блокирует синтез АФК, снижая при этом ЧСС,

уменьшая ЧДД, что способствует устраниению синдрома острой гипоксической дыхательной недостаточности и нецелесообразности дальнейшей оксигенотерапии.

Суть происходящих событий можно отразить схематично, что показано на рис. 5.

Увеличение ЧСС, вероятно, является суррогатом симпатического влияния из-за увеличения работы дыхания. Нормальная компенсированная адаптация сердечно-сосудистой системы к острой гипоксемии включает увеличение сердечного выброса, опосредованное преимущественно тахикардией, с умеренным повышением артериального давления. Использование высоких концентраций кислорода при высоком его потоке приводит к вазоспазму не только лёгочных капилляров, бронхиол, бронхов, но и коронарных артерий, потенцирующих недостаток поступления кислорода и снижение сердечного выброса, что, в свою очередь, приводит к снижению SaO_2 и SpO_2 , требующих коррекции подаваемого FiO_2 . Это создаёт «порочный круг гипероксии» и отсутствие положительной динамики в коррекции гипоксии и гипероксии.

Среди патофизиологических процессов, которые развиваются одновременно при COVID-19, существенную роль играют митохондриальная дисфункция и выработка активных форм кислорода (АФК), которые синтезируются в избытке и при гипероксии. АФК представляют собой группу молекул, которые включают кислородные радикалы и нерадикальные окислители, которые легко превращают уже в радикалы. Другим патофизиологическим процессом, описанным при COVID-19, является апоптоз, высокорегулируемый и консервативный механизм гибели клеток, при котором клетка саморазрушается [24]. Оба патофизиологических процесса (выработка АФК и апоптоз) и другие являются причиной синдрома полиорганной недостаточности, наблюдаемого при COVID-19.

Антиоксидантный эффект сукцинатов, на наш взгляд, обусловлен уникальной структурой фермента сукцинатдегидрогеназы, функционирующей на II участке комплекса дыхательной цепи митохондрий (рис. 6), где первый электрон, поступающий к убихинону через [3Fe-4S], может быстро перемещаться вперёд–назад между гемом и связанным убихиноном [18]. Таким образом, гем играет роль стока электронов, предотвращая их взаимодействие с молекулярным кислородом, которое привело бы к образованию АФК, как это происходит на комплексах I и III. Фундаментальная роль сукцината и сукцинатдегидрогеназы в цепи переноса электронов митохондрий делает эту связь жизненно важной для большин-

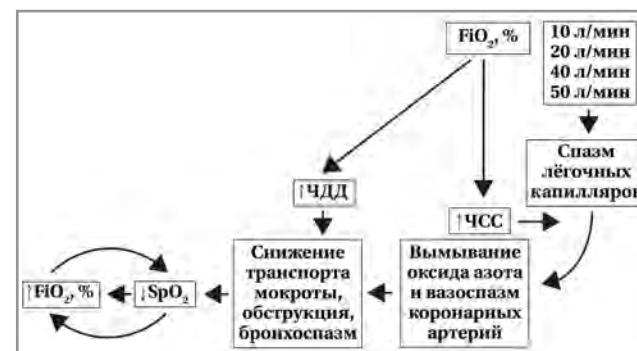


Рис. 5. Схема связи тактических вариантов оксигенотерапии с патологическими этапами реализации «порочного круга гипероксии».

Fig. 5. The connection between tactical options of oxygen therapy and pathological stages of the implementation of the «vicious circle of hyperoxia».

ства многоклеточных организмов, делеция генов этого фермента из генома летального. Сукцинатдегидрогеназа — комплекс II дыхательной цепи является единственным комплексом цепи, который не перекачивает протоны через мембрану и который полностью кодируется ядерной ДНК. Более того, сукцинатдегидрогеназа — комплекс II

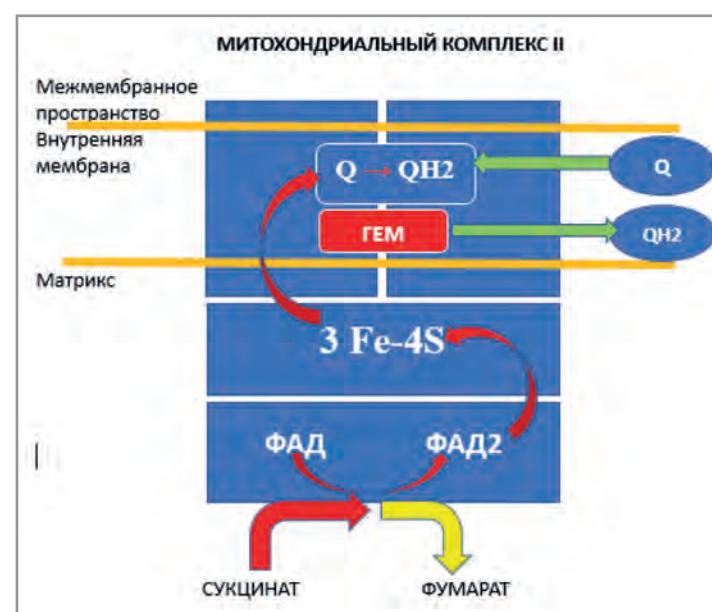


Рис. 6. Схематичное строение II комплекса дыхательной цепи, встроенного во внутреннюю мембрану (как «калитка»), имеющего в своей структуре 3 железных кластера.

Примечание. Путь электронов показан красными стрелками, перемещение электрона между гемом и связанным убихиноном зелёными стрелками.

Fig. 6. Schematic structure of complex II of the respiratory chain, built into the inner membrane (like a «gate»), which has 3 iron clusters in its structure.

Note. The path of electrons is shown using red arrows, the movement of an electron between heme and bound ubiquinone are shown using green arrows.

дыхательной цепи является единственным комплексом, который связан с циклом Кребса (получая из него сукцинат) и встроен во внутреннюю мембрану митохондрий. Устранение избытка АФК при его метаболизме — главный «токсический эффект» кислорода, устранимый сукцинатами.

В данном контексте использование сукцината с целью устранения токсических эффектов кислорода и, в первую очередь, синтеза АФК, патофизиологически обосновано и сегодня подтверждено рядом исследований, где использование сукцината улучшало потребление кислорода мышцами крыс с сепсисом [25], продлевало выживаемость [26], улучшало метаболический профиль печени [27] и снижало уровень АФК [28]. В частности, в исследовании G. B. Hill [29] были продемонстрированы защитные эффекты сукцината при использовании гипербарической оксигенации при экспериментальной гангрене.

В данном контексте необходимо подчеркнуть зарегистрированный в нашем исследовании более выраженный эффект Цитофлавина по отношению к гипероксии. Это по всей видимости объясняется более длительным периодом введения препарата, позволяющим поддерживать достаточную концентрацию, а также более широким спектром влияния комбинации веществ (инозин + никотинамид + рибофлавин + янтарная кислота) в структуре препарата на процессы тканевого дыхания и потребления кислорода. Все указанные ингредиенты Цитофлавина являются естественными метаболитами организма и стимулируют тканевое дыхание [30], обеспечивая метаболическую энергокоррекцию за счёт антигипоксической и антиоксидантной активности препарата [31], что в целом определяет его фармакологические свойства и лечебную эффективность [32].

Известно, что основным проявлением гипероксии является избыточный синтез АФК и активация процессов перекисного окисления липидов. Более выраженный эффект Реамберина по купированию тахикардии по всей видимости обусловлен не только волемическими свойствами препарата, как сбалансированного кристаллоида, позволяющими купировать и гиповолемию, и

расстройства кислотно-основного состояния (ацидоз), что неоднократно было продемонстрировано в многочисленных исследованиях [33]. По всей видимости улучшение сократительной функции миокарда связано с состоянием перехода сердечной мышцы из условий гипометаболизма (как проявление адаптивного процесса), которое сочетается с состоянием гибернации («бездействия») миокарда в ответ на гипероксию. На фоне же применения Реамберина возвращается к нормальному потреблению кислорода, что уже отмечалось в ряде исследований [34].

Наше исследование имеет ряд ограничений. Исследование проведено по данным историй болезни относительно молодых пациентов (средний возраст $34,2 \pm 5,7$ лет), не обременённых хроническими заболеваниями, поступавшими в ранний период от начала заболевания. Для подтверждения эффективного купирования сукцинатами токсических эффектов кислорода требуются более широкие исследования с оценкой тонких биохимических исследований (антиоксидантный статус, продукты перекисного окисления липидов), подтверждающих или исключающих положительную роль сукцинатов в условиях гипероксии.

Заключение

Таким образом, мониторинг ЧСС, ЧДД, SpO_2 , SvO_2 , pO_2 и PaO_2/FiO_2 в процессе проведения ВПО показал косвенный эффект купирования токсических эффектов кислорода (купирование тахипноэ и тахикардии) на фоне вводимых параллельно препаратов сукцинатов, которые обеспечивали эффективное усвоение кислорода и способствовали эффективному устранению гипоксии и гипоксемии, что подтверждалось динамичным снижением уровня лактата и, в целом, позволило в короткий период времени избежать длительной ВПО на фоне высоких концентраций кислорода. Полученные результаты требуют дополнительного подтверждения гипотезы эффективности использования сукцинатов для купирования токсических эффектов кислорода путём дальнейших исследований.

Литература/References

1. Nash G, Blennerhassett J.B, Pontoppidan H. Pulmonary lesions associated with oxygen therapy and artificial ventilation. *N Engl J Med.* 1967; 276 (7): 368–374. doi: 10.1056/NEJM196702162760702.
2. World Health Organization. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2017. The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee, 2017 (including the 20th WHO model list of essential medicines and the 6th WHO Model list of essential medicines for children) <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259481/9789241210157-eng.pdf?sequence=1>
3. Shoenfeld Y. Corona (COVID-19) time musings: Our involvement in COVID-19 pathogenesis, diagnosis, treatment, and vaccine planning. *Autoimmun Rev.* 2020 Apr 5:102538. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102538.
4. León-Jiménez A, Vázquez-Gandullo E, Montoro-Ballesteros F. Pulmonary toxicity by oxygen and COVID-19. *Med Intensiva (Engl Ed).* 2022 Jun; 46 (6): 353. doi: 10.1016/j.medine.2022.04.004.
5. Ухолкина Г.Б. Оксигенотерапия при сердечно-сосудистых заболеваниях и инфекции COVID-19. *РМЖ.* 2020; 11: 14–18. [Ukholkina G.B. Oxygen therapy for cardiovascular disease and COVID-19 infection. *RMJ.* 2020; 11: 14–18 (in Russian)]
6. Зильбер А.П., Тюрина Н.А. Большая медицинская энциклопедия. Под ред. Б.В. Петровского. 3-е изд. М.: Сов. Энциклопедия. 1974–1989; 10. [Zilber A.P, Tyurin N.A. Great medical encyclopedia. Ed. B.V. Petrovsky. 3rd ed. Moscow: Sov Encyclopedia. 1974–1989; 10 (in Russian)]
7. Chu D, Kim L, Young P, Zamiri N, et al. Mortality and morbidity in acutely ill adults treated with liberal versus conservative oxygen therapy

- (IOTA): a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2018; 391 (10131): 1693–705. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30479-3.
8. *Eastwood G., Bellomo R., Bailey M. et al.* Arterial oxygen tension and mortality in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*. 2012; 38: 91–98. doi: 10.1007/s00134-011-2419-6.
 9. *Helmerhorst H.J.E., Arts D.L., Schultz M.J. et al.* Metrics of arterial hyperoxia and associated outcomes in critical care. *Crit Care Med*. 2017; 45: 187–95. doi: 10.1097/CCM.0000000000002084.
 10. *Schjørring O.L., Klitgaard T.L., Perner A. et al.* Lower or higher oxygenation targets for acute hypoxic respiratory failure. *N Engl J Med* 2021; 384: 1301–1311. doi: 10.1056/NEJMoa2032510.
 11. *Заболотских И.Б., Киров М.Ю., Лебединский К.М. и др.* Анетезиолого-реанимационное обеспечение пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Методические рекомендации Общероссийской общественной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов». Вестник интенсивной терапии имени А.И. Салтанова. 2022; 1: 5–140. doi: <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2022-1-5-140>. [Zabolotskikh I.B., Kirov M.YU., Lebedinskij K.M. i dr. Anesthesiological and resuscitation support for patients with a new coronavirus infection COVID-19. Methodological recommendations of the All-Russian public organization «Federation of anesthesiologists and resuscitators». Vestnik Intensivnoj Terapii Imeni A.I. Saltanova. 2022; 1: 5–140. doi: <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2022-1-5-140>. (in Russian)]
 12. *Frat J.P., Ragot S., Coudroy R., Constantin J.M., Girault C., Prat G. et al.* Predictors of intubation in patients with acute hypoxic respiratory failure treated with a noninvasive oxygenation strategy. *Crit Care Med*. 2018; 46: 208–215. doi: 10.1097/CCM.00000000000002818.
 13. *Goh K.J., Chai H.Z., Ong T.H., Sewa D.W., Phua G.C., Tan Q.L.* Early prediction of high flow nasal cannula therapy outcomes using a modified ROX index incorporating heart rate. *J Intensive Care*. 2020 Jun 22; 8: 41. doi: 10.1186/s40560-020-00458-z.
 14. *Lodato R.F.* Decreased O₂ consumption and cardiac output during normobaric hyperoxia in conscious dogs. *J Appl Physiol*. (1985) 1989; 67 (4): 1551–1559. doi: 10.1152/jappl.1989.67.4.1551.
 15. *Farquhar H., Weatherall M., Wijesinghe M., Perrin K., Ranchord A., Simmonds M., Beasley R.* Systematic review of studies of the effect of hyperoxia on coronary blood flow. *Am Heart J*. 2009; 158 (3): 371–377.
 16. *Zwemer C.F., Whitesall S.E., D'Alecy L.G.* Hypoxic cardiopulmonary-cerebral resuscitation fails to improve neurological outcome following cardiac arrest in dogs. *Resuscitation*. 1995; 29 (3): 225–236. doi: 10.1016/j.ahj.2009.05.037.
 17. *Заболотских И.Б., Киров М.Ю., Лебединский К.М. и др.* Анетезиолого-реанимационное обеспечение пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Методические рекомендации Общероссийской общественной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов». Вестник интенсивной терапии имени А.И. Салтанова 2020; S1: 3–120. doi: <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2020-S1-9-120>. — EDN BVMRHN. [Zabolotskikh I.B., Kirov M.YU., Lebedinskij K.M. i dr. Anesthesiological and resuscitation support for patients with a new coronavirus infection COVID-19. Methodological recommendations of the All-Russian public organization «Federation of anesthesiologists and resuscitators». Vestnik Intensivnoj Terapii Imeni A.I. Saltanova 2020; S1: 3–120. doi: <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2020-S1-9-120>. — EDN BVMRHN. (in Russian)]
 18. *Магомедова К.М., Арсланова Р.М., Османова П.М., Гаджиева А.К.* Современные представления о структуре и механизмах функционирования сукцинатдегидрогеназы. Международный студенческий научный вестник. 2020; 3: 146. doi: <https://doi.org/10.17513/msnv.20157>. — EDN KYRJWJ. [Magomedova K.M., Arslanova R.M., Osmanova P.M., Gadzhieva A.K. Sovremennoye predstavleniya o strukture i mehanizmakh funkcionirovaniya sukcinatdegidrogenazy. Mezhdunarodnyj studencheskij nauchnyj vestnik. 2020; 3: 146. doi: <https://doi.org/10.17513/msnv.20157>. — EDN KYRJWJ].
 19. *Lukyanova L., Germanova E., Khmil N., Pavlik L., Mikheeva I., Shigaeva M., Mironova G.* Signaling role of mitochondrial enzymes and ultrastructure in the formation of molecular mechanisms of adaptation to hypoxia. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 11; 22 (16): 8636. doi: 10.3390/ijms22168636.
 20. *Tsai A., Cabrales P., Winslow R., Intaglietta M.* Microvascular oxygen distribution in the awake hamster window chamber model during hyperoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285: H1537–H1545. doi: 10.1152/ajpheart.00176.2003.
 21. *Asfar P., Singer M., Radermacher P.* Understanding the benefits and harms of oxygen therapy. *Intensive Care Med*. 2015; 41 (6): 1118–1121. doi: 10.1007/s00134-015-3670-z.
 22. *Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C.A.* Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*. 1997; 276 (5321): 2034–2037. doi: 10.1126/science.276.5321.2034.
 23. *McNulty P.H., Robertson B.J., Tulli M.A., Hess J., Harach L.A., Scott S., Sinoway L.I.* Effect of hyperoxia and vitamin C on coronary blood flow in patients with ischemic heart disease. *J Appl Physiol*. 2007; 102 (5): 2040–2045. doi: 10.1152/japplphysiol.00595.2006.
 24. *Muhoberac B.B.* What can cellular redox, iron, and reactive oxygen species suggest about the mechanisms and potential therapy of COVID-19? *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Dec 14; 10: 569709. doi: 10.3389/fcimb.2020.569709. PMID: 33381464.
 25. *Protti A., Carré J., Frost M.T. et al.* Succinate restores mitochondrial oxygen consumption in the skeletal muscle of rats with sepsis. *Crit Care Med*. 2007; 35: 2150–2155. doi: 10.1097/01.ccm.0000281448.00095.
 26. *Ferreira Florida, Ladière L., Vincent L.L., Malaisse W.J.* Prolongation of survival time by infusion of dimethyl ester of succinic acid in a sepsis model with ligation of the cecum and perforation. *Horm Metab Res*. 2000; 32: 335–336. doi: 10.1055/s-2007-978647.
 27. *Malaisse W.J., Nadi A.B., Ladière L., Zhang T.M.* Protective effects of infusion of dimethyl ester of succinic acid in experimental endotoxemia. *Nutrition*. 1997; 13: 330–341. PMID: 9178284.
 28. *Chapela S.P., Burgos I., Congost C. et al.* Parenteral succinate reduces systemic ROS production in rats with sepsis, but does not reduce creatinine levels. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 1928945. doi: 10.1155/2018/1928945.
 29. *Hill G. B.* Hyperbaric oxygen exposures at 3 and 4 atmospheres absolute pressure for experimental gas gangrene: succinate protection against oxygen toxicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972 Nov; 2 (5): 384–389. doi: 10.1128/AAC.2.5.384.
 30. *Клюйко Д.А., Корик В.Е., Жидков С.А.* Применение цитофлавина в комплексном лечении острого панкреатита. Новости хирургии. 2012; 20 (3): 22–27. [Klyukko D.A., Korik V.E., Zhidkov S.A. The use of cytoflavin in the complex treatment of acute pancreatitis. Novosti khirurgii. 2012; 20 (3): 22–27 (in Russian)]
 31. *Доровских В.А., Симонова Н.В., Панфилов С.В., Мотальгина А.В., Лялина А.А., Махмудова А.М., Штарберг М.А.* Влияние цитофлавина и его составных компонентов на перекисное окисление липидов в эксперименте. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2022; 85 (3): 8–12. doi: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2022-85-3-8-12>. [Dorovskikh V.A., Simonova N.V., Panfilov S.V., Motalygina A.V., Lyalina A.A., Makhmudova A.M., Shtarberg M.A. The effect of cytoflavin and its constituent components on lipid peroxidation in the experiment Ehksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya. 2022; 85 (3): 8–12. doi: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2022-85-3-8-12>. (in Russian)]
 32. *Салихова К.Ш., Рустамова М.Ш., Салимов Ш.Т., Абдусаматов Б.З.* Влияние цитофлавина на эффективность интенсивной терапии новорождённых с некротизирующим энтероколитом. Вопросы практической педиатрии. 2021; 16 (6): 63–67. doi: <https://doi.org/10.20953/1817-7646-2021-6-63-67>. [Salikhova K.Sh., Rustamova M.Sh., Salimov Sh.T., Abdusamatov B.Z. Influence of cytoflavin on the effectiveness of intensive care of newborns with necrotizing enterocolitis. Questions of Practical Pediatrics. 2021; 16 (6): 63–67. doi: <https://doi.org/10.20953/1817-7646-2021-6-63-67>. (in Russian)]
 33. *Климов А.Г., Бирюков А.Н., Тарасенко М.Ю., Грицай А.Н., Струков Е.Ю.* Использование реамберина при проведении противошоковой терапии у тяжелообожжённых. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2020; 2: 95–99. doi: <https://doi.org/10.17116/hirurgia202002195>. [Klimov A.G., Biryukov A.N., Tarasenko M.Yu., Gritsay A.N., Strukov E.Yu. The use of reamberin in antishock therapy in severely burned patients. Pirogov Russian Journal of Surgery = Khirurgiya. Zurnal im. N.I. Pirogova. 2020; (2): 95–99. doi: <https://doi.org/10.17116/hirurgia202002195>. (in Russian)]
 34. *Толкач А.Б., Долгих В.Т.* Влияние реамберина на кислородный баланс, окислительный стресс и лёгочную дисфункцию у пациентов с абдоминальным сепсисом. Бюллетень сибирской медицины. 2012; 11 (3): 69–75. [Tolkach A.B., Dolgikh V.T. Effect of Reamberin on oxygen balance, oxidative stress and pulmonary dysfunction in patients with abdominal sepsis. Byulleten' sibirskoj meditsiny. 2012; 11 (3): 69–75. (in Russian)]

Информация об авторах

Говорова Наталья Валерьевна — д. м. н., заведующая кафедрой анестезиологии и реаниматологии ДПО, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Омск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0495-902X

Цилина Светлана Владимировна — к. м. н., ассистент кафедры анестезиологии и реаниматологии ДПО, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Омск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6322-2095

Хиленко Ирина Анатольевна — врач анестезиолог-реаниматолог, высшей категории, БУЗ Омской области Городская клиническая больница № 11, Омск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9666-4463

Резых Виктор Витальевич — студент 6 курса лечебного факультета «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Омск, Россия. ORCID ID: 0009-0005-3610-4770

Орлов Юрий Петрович — д. м. н., доцент, профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии ДПО, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Омск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6747-998X

About the authors

Nataly V. Govorova — D. Sc. in Medicine, Head of the Department of Anesthesiology and Reanimatology, Omsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Omsk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0495-902X

Svetlana V. Tsilina — Ph. D. in Medicine, Assistant of the Department of Anesthesiology and Reanimatology, Omsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Omsk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6322-2095

Irina A. Khilenko — anesthesiologist-resuscitator of the highest category, Omsk Region City Clinical Hospital No. 11, Omsk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9666-4463

Viktor V. Rezvykh — 6th year student of the Faculty of Medicine, Omsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Omsk, Russia. ORCID ID: 0009-0005-3610-4770

Yuriii P. Orlov — D.Sc. in Medicine, Associate Professor, Professor of the Department of Anesthesiology and Reanimatology, Omsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Omsk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6747-998X

Оценка синергетического эффекта комбинации доксорубицина и вориностата в отношении опухолевых клеток молочной железы с помощью модели Loewe

*М. Р. МОЛЛАЕВА¹, Н. Г. ЯББАРОВ¹, М. Б. СОКОЛ¹,
М. В. ЧИРКИНА¹, Е. Д. НИКОЛЬСКАЯ¹

¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Evaluation of the Synergistic Effect of the Combination of Doxorubicin and Vorinostat on Breast Tumor Cells Using the Loewe Model

*MARIIA R. MOLLAeva, NIKITA G. YABBAROV, MARIYA B. SOKOL,
MARGARITA V. CHIRKINA, ELENA D. NIKOLSKAYA

Emanuel Institute of Biochemical Physics of the RAS (IBCP RAS), Moscow, Russia

Резюме

Комбинация двух или более лекарственных средств находит всё большее применение при разработке новых схем лечения различных заболеваний. Так, использование комбинаций ингибиторов гистон деацетилаз с традиционными препаратами для лечения солидных злокачественных новообразований является актуальным направлением. Данное исследование посвящено поиску эффективного соотношения вориностата (SAHA) и доксорубицина (DOX) для терапии различных подтипов опухоли молочной железы. С помощью МТТ-теста оценили выживаемость клеток линий HCC-1954, SKBR-3, MCF-7/ADR, MDA-MB-231 в условиях инкубации с 64 вариантами концентрационных комбинаций SAHA и DOX, что позволило определить эффект взаимодействий комбинаций SAHA/DOX (антагонистический, аддитивный, синергетический). Провели расчёт индекса синергизма SAHA/DOX с помощью математической модели Loewe. Эффект соотношений SAHA/DOX, обладающих наибольшим индексом синергизма в отношении каждой линии опухолевых клеток, подтверждался с помощью метода Чоу-Талалай. Было показано, что наибольший синергизм комбинация SAHA/DOX проявлялся в отношении клеток линий HCC-1954, MCF-7/ADR и SKBR-3, относящихся к HER2-позитивному подтипу. Среднее значение соотношений SAHA/DOX, обладающих наибольшим синергизмом в отношении опухолевых клеток, составило 30:1 (SAHA к DOX, соответственно). Способность выявленной комбинации эффективно стимулировать апоптоз была подтверждена на наиболее чувствительных к SAHA/DOX терапии клетках линии HCC-1954. Таким образом, модель Loewe позволила выявить комбинацию препаратов, обладающую синергетическим эффектом, что подтверждалось методом Чоу-Талалай, а полученные данные свидетельствуют о перспективности использования комбинации SAHA/DOX (30:1) в лечении HER2-позитивного подтипа опухолей молочной железы.

Ключевые слова: доксорубицин; вориностат; цитотоксическая активность; синергизм; апоптоз; рак молочной железы

Для цитирования: Моллаева М. Р., Яббаров Н. Г., Сокол М. Б., Чиркина М. В., Никольская Е. Д. Оценка синергетического эффекта комбинации доксорубицина и вориностата в отношении опухолевых клеток молочной железы с помощью модели Loewe. Антибиотики и химиотерапия. 2023; 68: 7–8: 53–61. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-53-61>.

Abstract

The combination of two or more medications is increasingly more common in the development of new treatment guidelines for common diseases. Thus, the use of combinations of histone deacetylase inhibitors with chemotherapeutic agents is a current trend in solid tumor treatment. The aim of this study was to investigate an effective vorinostat (SAHA) to doxorubicin (DOX) ratio for the treatment of different subtypes of breast cancer. The survival of HCC-1954, SKBR-3, MCF-7, MCF-7/ADR, MDA-MB-231 cell lines was assessed under incubation conditions with 64 variants of SAHA and DOX combinations using the MTT assay. This made it possible to determine the effect of interactions of SAHA/DOX combinations (antagonistic, additive, synergistic), as well as calculate the SAHA/DOX synergy index using the Loewe additivity model. The effect of SAHA/DOX ratios with the highest synergistic index for each tumor cell line was confirmed using the Chou-Talalay method. It was shown that the SAHA/DOX combination exhibited the greatest synergism in relation to HCC-1954, MCF-7/ADR and SKBR-3 cell lines belonging to the HER2-positive subtype. The average value of SAHA/DOX ratio with the highest synergy against breast cancer cells was 30:1 (SAHA to DOX, respectively). The ability of SAHA/DOX combination to effectively trigger apoptosis was confirmed in the most sensitive to SAHA/DOX therapy HCC-1954 cells. Thus, the Loewe

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Косыгина, д. 4, ИБХФ, г. Москва, Россия, 119334. E-mail: mollaevamariia@gmail.com

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 4 Kosygina, st., Emanuel Institute of Biochemical Physics, Moscow, 119334 Russia.
E-mail: mollaevamariia@gmail.com

model made it possible to identify the drug combination with the highest synergistic anticancer effect, which was confirmed using Chou-Talalay method. The data obtained demonstrates great potential of SAHA/DOX combination (30:1) for the treatment of HER2-positive breast cancer.

Keywords: doxorubicin; vorinostat; cytotoxic activity; synergy; apoptosis; breast cancer

For citation: Mollaeva M. R., Yabbarov N. G., Sokol M. B., Chirkina M. V., Nikolskaya E. D. Evaluation of the synergistic effect of the combination of doxorubicin and vorinostat on breast tumor cells using the Loewe model. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 7-8: 53–61. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-53-61>.

Введение

Злокачественные опухоли молочной железы являются наиболее распространённым онкологическим заболеванием среди женщин [1]. В 2020 г. в России было зарегистрировано 65 тыс. новых случаев, что составило 21,2% от всех диагностированных злокачественных новообразований [2]. Сложность лечения данного заболевания состоит в гетерогенности опухоли молочной железы и наличии различных молекулярных подтипов. Среди них выделяют люминальный А и люминальный В (наличие рецепторов эстрогена и прогестерона, отсутствие экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2)); HER2-позитивный подтип (характеризуется экспрессией HER2, может разделяться на подтипы ER+HER2+ или люминальный ERBB2+ в зависимости от наличия рецепторов гормонов); базально-подобный подтип или тройной негативный (отсутствие рецепторов гормонов и HER2). Молекулярный подтип опухоли молочной железы может в значительной мере влиять на прогноз заболевания и методы лечения [3, 4].

Наиболее распространёнными видами терапии пациентов с опухолью молочной железы являются хирургия, химиотерапия, радиотерапия и гормональная терапия. Хирургия и радиотерапия применяются для лечения опухоли молочной железы на ранней стадии; для лечения метастатического рака молочной железы используется комбинация химиотерапии и гормональной терапии [5]. Однако появление мутаций в опухолевых клетках, приводящих к изменению молекулярных мишений, появлению лекарственной устойчивости и прогрессированию опухоли, может влиять на эффективность терапии, в связи с чем, оптимизация существующих схем лечения и поиск новых комбинаций лекарственных препаратов являются актуальными задачами для исследования [6, 7].

Использование полихимиотерапии (комбинационной химиотерапии) в лечении опухолевых заболеваний имеет значительные преимущества за счёт снижения доз вводимых препаратов, уменьшения побочных эффектов и преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток [8–10]. На сегодняшний день полихимиотерапия находит широкое применение

в клинической практике [3]. Полихимиотерапия, включающая доксорубицин (DOX), является стандартной терапией первой линии опухолевых заболеваний, обеспечивающей высокую частоту ремиссии. DOX и его аналоги (даунорубицин, эпирубицин) — известные антрациклические антибиотики, применяющиеся для лечения широкого ряда злокачественных новообразований, в том числе опухоли молочной железы [11]. Их механизм действия заключается в ингибировании клеточной пролиферации и стимулировании апоптоза, однако возникающая лекарственная устойчивость опухолевых клеток к ним зачастую может снижать эффективность лечения [12]. В настоящее время для повышения чувствительности к терапии DOX злокачественных новообразований активно исследуются вещества-проксиданты, поскольку известно, что повышение активных форм кислорода может приводить к активации программируемой гибели клеток и ингибированию ферментов, ответственных за возникновение резистентности клеток к химиотерапевтическим препаратам [13].

Вориностат (SAHA) — ингибитор гистон деацетилаз, обладающий противоопухолевой активностью за счёт образования активных форм кислорода, ингибирования ангиогенеза, клеточной пролиферации и стимулирования апоптоза [13–15]. В источниках литературы указывается, что SAHA может способствовать снижению активности транскрипционного фактора NRF2, повышая тем самым, чувствительность опухолевых клеток к DOX [16, 17]. Показано, что применение SAHA повышает эффективность DOX в отношении клеток карциномы шейки матки человека HeLa, нейробластомы человека SK-N-Be(2)C и остеосаркомы человека MG-63; также известно, что комбинация SAHA/DOX находится на II стадии клинических испытаний для лечения острого лимфобластного лейкоза [18–22]. Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что DOX и SAHA являются перспективной комбинацией для лечения опухолевых заболеваний, а исследование их комбинированного влияния на опухолевые клетки может выявить новые мишени для полихимиотерапии и способствовать развитию новых протоколов лечения злокачественных новообразований.

Таким образом, анализ активности комбинаций SAHA/DOX в отношении различных подтипов

опухолевых клеток молочной железы позволит выявить наиболее чувствительные к препаратам клетки, а также оценить эффект их совместного действия (синергетический, аддитивный, антагонистический). Предполагается, что определение более чувствительных и резистентных к лечению подтипов клеток может способствовать появлению новых комбинаций препаратов, направленных на повышение эффективности химиотерапии, а также уточнению механизмов цитотоксической активности комбинации.

В последние годы, в различных областях науки набирает популярность использование математических подходов на основе построения многомерных матриц для выявления взаимозависимостей: для оптимизации составов полимерных плёнок, волокон и частиц в химии полимеров; для оптимизации соотношений лекарственных препаратов в комбинационной терапии; для оптимизации условий проведения анализов в аналитической химии и т. д. [23]. На основе матриц зависимости были выбраны оптимальные соотношения SAHA и DOX, было подтверждено наличие сильного синергизма комбинаций препаратов в отношении опухолевых клеток молочной железы и рассчитано среднее значение соотношения концентраций между SAHA и DOX, оптимальное для всех исследованных линий. Подобный подход к определению соотношений веществ обеспечивает приоритетность эффективных комбинаций для дальнейших доклинических исследований, а также может применяться для дизайна новых носителей и созданию новых схем лечения в клинической практике. Также в отношении наиболее чувствительных клеток линии НСС-1954 был проведён сравнительный анализ способности оптимизированного соотношения SAHA/DOX и индивидуальных препаратов стимулировать апоптоз.

Материал и методы

В работе использованы: воринаст (SAHA, MedChem-Express, США); доксорубицин (DOX, Sigma-Aldrich, США); DMEM (Sigma-Aldrich, США); RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США); эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС, Sigma-Aldrich, США); гентамицин (Sigma-Aldrich, США); фосфатно-солевой буфер (ФСБ, Amresco, США); диметилсульфоксид (ДМСО, Sigma-Aldrich, США); трипсин (Serva, Германия); этилендиаминететрауксусная кислота (ЭДТА, Sigma-Aldrich, США), пропидий иодид (Biolegend, США); аннексин V (Biolegend, США); 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ, Sigma-Aldrich, США).

Культивирование клеток. Клетки линий MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), MCF-7/ADR (аденокарцинома молочной железы человека, устойчивая к адриамицину и обладающая фенотипом множественной лекарственной устойчивости) и MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы человека) культивировали на среде DMEM или RPMI 1640 в случае клеток линий SKBR-3 (аденокарцинома молочной железы человека) и НСС-1954 (карцинома молочной железы человека). К культуральным средам добавляли 10% ЭБС и 50 мкг/мл гентамицина. Культивирование проводили в

пластиковых фляконах ёмкостью 25 см² при +37°C в увлажнённой атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки рассевали до достижения 80% конфлюэнтности с использованием раствора трипсина-ЭДТА (0,05% трипсина-ЭДТА для MCF-7, MCF-7/ADR и 0,25% трипсина-ЭДТА для MDA-MB-231, SKBR-3 и НСС-1954).

Анализ выживаемости клеток. Клетки линий MCF-7, MCF-7/ADR, НСС-1954, SKBR-3 и MDA-MB-231 рассевали на 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток на лунку) за 24 ч до эксперимента и инкубировали в стандартных условиях. DOX и SAHA индивидуально и в комбинации добавляли к клеткам в диапазоне концентраций 0,01–816 мкМ и 3,4–430 мкМ, соответственно, для клеток линии MCF-7; 0,55–70 мкМ и 0,03–3,2 мкМ, соответственно, для клеток линии MCF-7/ADR; 0,004–0,5 мкМ и 2,9–370 мкМ, соответственно, для клеток линии НСС-1954; 0,001–0,14 мкМ и 0,04–4,5 мкМ, соответственно, для клеток линии SKBR-3; 0,08–1 мкМ и 0,31–40 мкМ, соответственно, для клеток линии MDA-MB-231. Далее клетки инкубировали в течение 72 ч. Выживаемость клеток определяли с помощью стандартного МТТ анализа [24]. Жизнеспособность клеток определяли по формуле 1:

$$\text{Выживаемость} = \frac{A_{\text{образца}}}{A_{\text{контр}}} \times 100\% \quad (1),$$

где $A_{\text{образца}}$ — значение оптической плотности клеток, инкубированных с экспериментальными образцами; $A_{\text{контр}}$ — значение оптической плотности контрольных клеток, инкубированных только в культуральной среде.

На основе кривых выживаемости определяли концентрацию вещества, при которой наблюдалась гибель 50% клеток (значение IC₅₀). Средние значения выживаемости рассчитывались в Excel (Microsoft Corporation, Редмонд, Вашингтон, округ Колумбия, США), а значения IC₅₀ рассчитывались в OriginPro (версия 2020b, OriginLab Corp., Нортгемптон, Массачусетс, США).

Анализ синергетического эффекта комбинаций DOX/SAHA, определение индекса синергизма и комбинационного индекса. Для построения матрицы зависимости доз DOX и SAHA, оценки синергетических взаимодействий DOX/SAHA и чувствительности клеток линий MCF-7, MCF-7/ADR, НСС-1954, SKBR-3 и MDA-MB-231 использовалось программное обеспечение SynergyFinder 2.0 (<http://www.synergyfinder.org/>). На основе значений IC₅₀ SAHA и DOX, полученных в отношении каждой клеточной линии для каждого соединения (индивидуально), составляли матрицу планирования эксперимента, где значения IC₅₀ являлись исходными значениями для последующих совместных разведений SAHA и DOX. Так, для клеток MCF-7 матрица (рис. 1) состояла из 8 концентраций DOX (по горизонтали, справа налево: 0,82–0,006 мкМ) и 8 концентраций SAHA (по вертикали, снизу вверх: 3,4–430,0 мкМ); для MCF-7/ADR использовали концентрации DOX в диапазоне 0,55–70,00 мкМ и SAHA — 0,03–3,20 мкМ; для MDA-MB-231 диапазон концентраций DOX составил 0,08–1,00 мкМ, а SAHA — 0,31–40,00 мкМ; для НСС-1954 концентрация DOX была в диапазоне 0,004–0,500 мкМ, а SAHA — 2,9–370,0 мкМ; для SKBR-3 диапазон концентраций DOX был 0,001–0,140 мкМ, а SAHA — 0,04–4,50 мкМ. Далее с помощью МТТ теста оценивали выживаемость клеток в условиях инкубации с 64 комбинациями SAHA и DOX. Рассчитанные значения выживаемости вносили в программу SynergyFinder 2.0, с помощью которой получали матрицы зависимости доз DOX/SAHA (см. рис. 1) и определяли индекс синергизма для 64 комбинаций SAHA/DOX.

Для оценки комбинационного индекса выбранных соотношений SAHA и DOX использовалось программное обеспечение CompuSyn version 1.0 (Biosoft, Сан-Франциско, Калифорния, США), позволяющее с помощью уравнения медианного эффекта определить синергизм совместного действия (модель Чоу–Талалай) DOX и SAHA [25]. Для этого результаты выживаемости опухолевых клеток молочной железы после инкубации с 64 комбинациями SAHA/DOX вно-

сили в программу CompuSyn version 1.0 и определяли комбинационный индекс для выбранных соотношений.

Анализ клеточной гибели. Клетки линии HCC-1954 рассевали на чашки Петри в количестве 1×10^5 в 1,5 мл культуральной среды за 24 ч до эксперимента. DOX, SAHA и их комбинации добавляли к клеткам в концентрации 500 нМ (для DOX) и 15 мкМ (для SAHA) и инкубировали 2 ч в CO₂-инкубаторе. Затем клетки переносили в пробирки типа эпандорф и центрифугировали в течение 5 мин при 400 g, +4°C и удаляли питательную среду. После чего клетки инкубировали с 10 мкл пропидий йода в концентрации 20 мкг/мл и 10 мкл аннексина V в концентрации 5 мкг/мл в течение 15 мин. Клетки дважды промывали ФСБ и измеряли их интенсивность флуоресценции на проточном цитофлуориметре Cyan ADP (лех 488 нм, лем 617 нм — для пропидий йода и лем 525 нм — для аннексина V) [26].

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Редмонд, Вашингтон, округ Колумбия, США) и в OriginPro (версия 2020b, OriginLab Corp., Нортгемптон, Массачусетс, США). Значения показателей при $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Для определения наиболее чувствительной линии опухолевых клеток молочной железы человека для комбинированной терапии препаратами SAHA и DOX в работе были исследованы линии различных подтипов: MCF-7 (люминальный А подтип); MCF-7/ADR (обладающий фенотипом множественной лекарственной устойчивости HER2-позитивный подтип), SKBR-3 и HCC-1954 (HER2-позитивные подтипы); MDA-MB-231 (базально-подобный подтип) (табл. 1) [26–28]. Поскольку механизмы действия SAHA и DOX отличаются, необходимо выявить закономерности влияния препаратов на различные подтипы опухолевых клеток молочной железы и оценить эффективность воздействия комбинаций препаратов на опухолевые клетки. Выполнение поставленных задач позволит определить оптимальное соотношение SAHA/DOX для выбранных

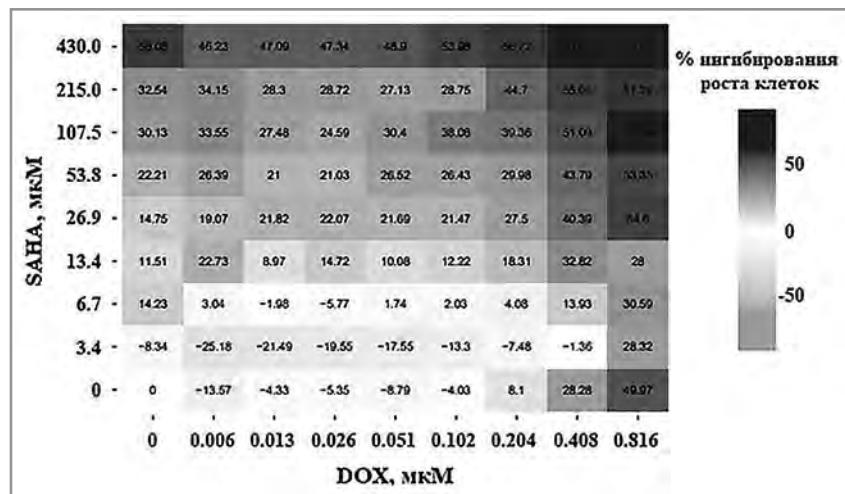


Рис. 1. Матрица зависимости доз DOX и SAHA для оценки синергизма в отношении клеток линии MCF-7, построенная с помощью программы SynergyFinder 2.0.

Примечание. Принцип построения матриц сохранялся для всех опухолевых клеток молочной железы (за исключением концентраций).

Fig. 1. Dose dependence matrix of DOX and SAHA for assessing synergy in relation to MCF-7 cells, constructed using the SynergyFinder 2.0 program.

Note. The principle of matrices construction was the same for all breast tumor cells (with the exception of concentrations).

опухолевых клеток молочной железы и вычислить среднюю эффективную комбинацию SAHA и DOX в отношении всех линий (подтипов) опухолевых клеток молочной железы. Такой подход позволит проводить персонализированное лечение при определённом подтипе опухоли молочной железы, с выбором оптимальной комбинации для конкретного случая, а также назначать общее лечение комбинацией препаратов, которая является одинаково эффективной для всех подтипов опухоли молочной железы.

Первый этап работы заключался в определении индивидуальных значений IC₅₀, концентраций SAHA и DOX, при которых наблюдалась гибель 50% клеток. Цитотоксическую активность SAHA и DOX по отдельности в отношении вышеуказанных опухолевых линий клеток оценивали с помощью МТТ теста, значения IC₅₀ приведены в табл. 2.

Значения индивидуальных действующих концентраций IC₅₀ для SAHA и DOX (см. табл. 2), являлись начальными значениями для составления матрицы зависимости доз между 8 кон-

Таблица 1. Классификация подтипов опухолей молочной железы в соответствии с особенностями экспрессии генов [26–28]

Table 1. Classification of breast tumor subtypes according to gene expression patterns [26–28]

Линия клеток/Статус	Рецептор эстрогена	Рецептор прогестерона	HER2
HCC-1954	—	—	+
MCF-7	+	+	—
MCF-7/ADR	—	—	+
MDA-MB-231	—	—	—
SKBR-3	—	—	+

Таблица 2. Результаты анализа цитотоксической активности DOX и SAHA (добавленных индивидуально)
Table 2. Results of DOX and SAHA cytotoxic activity analysis (added individually)

Линия клеток	SAHA	DOX
IC ₅₀ , мкМ		
HCC-1954	370	0,5
MCF-7	430	0,8
MCF-7/ADR	3,2	70
MDA-MB-231	40	1
SKBR-3	4,5	0,1

центрациями SAHA и 8 концентрациями DOX (см. рис. 1). На основе составленной матрицы проводили эксперимент по определению выживаемости опухолевых клеток молочной железы человека после внесения комбинаций препаратов с помощью МТТ теста.

Полученные значения выживаемости вносили в программу SynergyFinder 2.0 и определяли индексы синергизма (ИС) для 64 вариантов комбинаций SAHA и DOX. Матрицы позволяли оценить степень синергизма препаратов по модели аддитивности Loewe (рис. 2, *a*–*e*) [29]. Модель Loewe широко используется для оценки синергизма препаратов и позволяет выявить отсутствие синергетического или антагонистического эффекта между ними [29]. Значения индекса синергизма, ниже –10 указывают на антагонистический эффект между препаратами, значения, находящиеся в диапазоне от –10 до +10, свидетельствуют об аддитивном эффекте взаимодействия, а значения выше +10 характеризуют синергетические взаимодействия между препаратами [31].

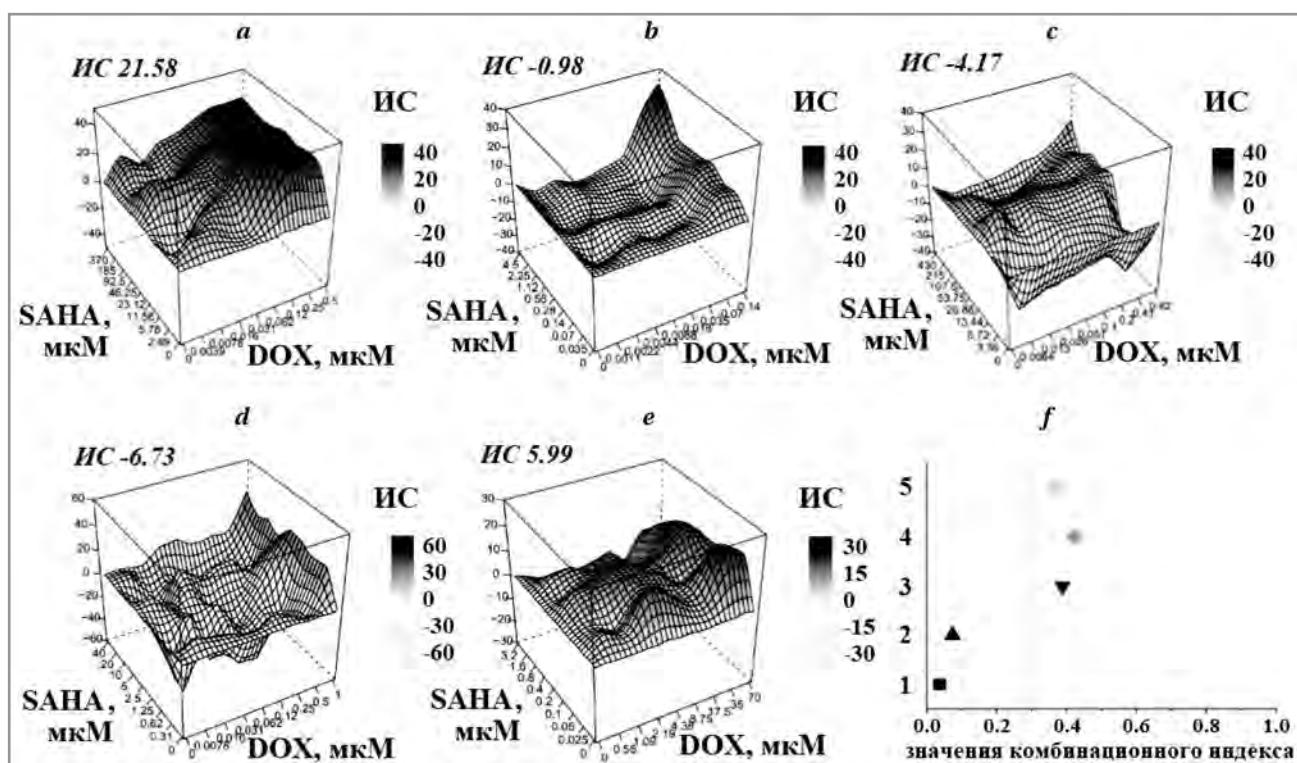


Рис. 2. Трёхмерные плоскости индекса синергизма (ИС), построенные с использованием модели аддитивности Loewe (средние значения ИС для каждой линии клеток указаны слева сверху) и описывающие синергическое и антагонистическое влияние концентраций SAHA и DOX на клетки культур опухолевых линий HCC-1954 (*a*); SKBR-3 (*b*); MCF-7 (*c*); MDA-MB-231 (*d*) и MCF-7/ADR (*e*).

Примечание. Точечный график, демонстрирующий значения комбинационного индекса (по оси X: значения показателя больше 1 указывают на небольшой синергизм, 0,7–1,0 – синергизм, 0,3–0,7 – сильный синергизм) для выбранных (на основе математической модели Loewe) комбинаций DOX и SAHA в отношении клеток (по оси Y) HCC-1954 (1), SKBR-3 (2), MCF-7 (3), MDA-MB-231 (4), MCF-7/ADR (5) (*e*) [30].

Fig. 2. Three-dimensional synergy index (SI) planes constructed using the Loewe additivity model (average SI values for each cell line are indicated at the top left); the planes describe the synergistic and antagonistic effects of SAHA and DOX concentrations on cells from HCC-1954 (*a*); SKBR-3 (*b*); MCF-7 (*c*); MDA-MB-231 (*d*) and MCF-7/ADR (*e*) tumor cell lines.

Note. Scatter plot showing combination index values (X-axis: index values greater than 1 indicate slight synergism, 0.7–1.0 – synergism, 0.3–0.7 – strong synergism) for selected (based on Loewe additivity model) combinations of DOX and SAHA on cells (Y-axis) HCC-1954 (1), SKBR-3 (2), MCF-7 (3), MDA-MB-231 (4), MCF-7/ADR (5) (*e*) [30].

Построенные на основе дозозависимых матриц графические трёхмерные диаграммы Loewe (см. рис. 2) указывают на выраженное синергетическое действие широкого диапазона комбинаций SAHA и DOX в отношении клеток НСС-1954 (см. рис. 2, a) и аддитивный эффект в отношении линий SKBR-3 и MCF-7/ADR (см. рис. 2, b и e — тёмные, выпуклые области в диаграммах), в то время как шероховатая поверхность диаграмм на рис. 2, c и d свидетельствует о слабом синергизме и преимущественном аддитивном эффекте SAHA и DOX в отношении клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 [31].

На основе данных литературы известно, что SAHA снижает жизнеспособность HER2-позитивных опухолевых клеток и часто используется в комбинации с противоопухолевыми препаратами для повышения чувствительности клеток к химиотерапии [33]. Поскольку клетки линии НСС-1954, SKBR-3 и MCF-7/ADR относятся к HER2-позитивному подтипу (см. табл. 1), можно предположить, что синергизм комбинации SAHA/DOX достигается за счёт того, что SAHA ингибирует сигнальный путь Akt/NF-кB в клетках, что приводит к снижению клеточной пролиферации и повышению их чувствительности к DOX [27, 34, 35]. Стоит отметить, что механизм, при котором SAHA повышает чувствительность резистентных опухолевых клеток к DOX не изучен полностью, но существуют данные о том, что SAHA снижает экспрессию антиапоптотических белков BCL-2 и BCL-XL и способствует активации апоптоза наряду с воздействием DOX. Такой механизм синергетического действия SAHA/DOX также может являться одной из причин чувствительности клеток линии MCF-7/ADR к комбинации SAHA/DOX [36]. Также в источниках литературы отмечено, что SAHA может образовывать активные формы кислорода, которые способствуют преодолению устойчивости опухолевых клеток к DOX [37].

Таким образом, исходя из результатов построенной математической модели синергизма

Loewe (см. рис. 2, a–e) можно сделать вывод о синергетическом эффекте комбинации SAHA и DOX в отношении HER2-положительного подтипа опухолевых клеток молочной железы. Корреляция между показателями синергизма и подтипами клеток свидетельствует о перспективности данного подхода в определении мишеней для эффективной терапии.

Далее на основе модели Loewe и рассчитанных значений ИС для каждой из 64 комбинаций SAHA/DOX в отношении всех исследуемых опухолевых линий клеток были выбраны самые высокие показатели ИС для каждой линии и отмечены соотношения SAHA/DOX, при которых они были получены (табл. 3).

Из отмеченных концентраций SAHA и DOX было выбрано одно соотношение SAHA/DOX для каждой линии клеток молочной железы (см. табл. 3, выделено шрифтом). На основе выбранных соотношений SAHA/DOX определяли комбинационный индекс в программе CompuSyn version 1.0, по аналогии с программным обеспечением SynergyFinder 2.0 (см. рис. 2, f). С помощью данного метода также было доказано, что выбранные соотношения SAHA/DOX (см. табл. 3) обладали значительным синергизмом в отношении HER2-положительных клеток линий НСС-1954 и SKBR-3, что коррелирует с результатами полученных моделей синергизма (см. рис. 2, a, b, f). Предполагается, что более низкие значения синергизма комбинации в отношении клеток линии MCF-7/ADR по сравнению с SKBR-3 связаны с разницей в оптимальных соотношениях SAHA и DOX (для MCF-7/ADR требуется большая концентрация DOX, чем для остальных линий клеток).

После подтверждения синергетического эффекта выбранных соотношений SAHA/DOX, было рассчитано среднее соотношение SAHA и DOX (30:1, соответственно), которое, как предполагается, будет обладать значительным синергизмом в отношении всех подтипов опухоли молочной железы.

Таблица 3. Максимальные значения ИС и соотношения SAHA/DOX, при которых они были получены с помощью модели Loewe, в отношении линий опухолевых клеток молочной железы
Table 3. Maximum SI values and SAHA/DOX ratios at which they were obtained using the Loewe model for breast tumor cell lines

Линия клеток	DOX, мкМ	SAHA, мкМ	ИС
НСС-1954	0,50	370,00	31,45
	0,50	23,12	31,82
SKBR-3	0,14	4,50	32,73
	0,41	107,50	6,91
MCF-7	0,82	26,88	3,15
	1,00	40,00	35,01
MDA-MB-231	35,00	3,20	3,46
	2,19	0,20	8,47
	35,00	0,10	7,50

Примечание. Полужирный шрифт — объяснения в тексте.

Note. Bold font — explanations in the article.

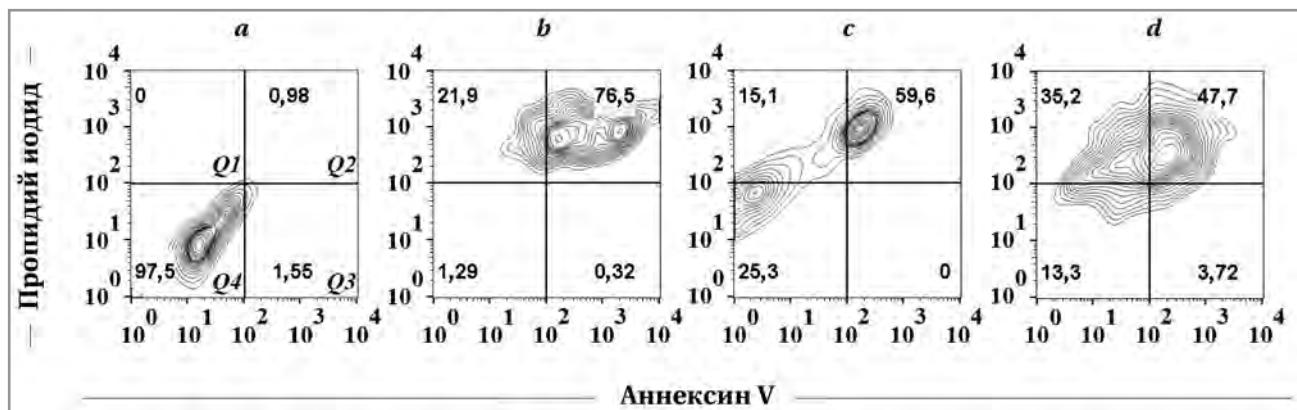


Рис. 3. Уровень апоптоза в клетках HCC-1954 после инкубации с 15 мкМ SAHA (b), 500 нМ DOX (c) и комбинацией SAHA/DOX (30:1, концентрации 15 мкМ для SAHA и 500 нМ для DOX) (d) в течении 48 ч. Клетки, без добавления препаратов (a).

Fig. 3. Level of apoptosis in HCC-1954 cells after incubation with 15 μ M SAHA (b), 500 nM DOX (c) and a combination of SAHA/DOX (30:1, 15 μ M concentration for SAHA and 500 nM for DOX) (d) within 48 hours. Cells without adding the medications (a).

Оптимальное соотношение SAHA и DOX (30:1) для терапии всех исследуемых линий опухолевых клеток молочной железы далее было использовано для изучения типа гибели клеток методом двойного окрашивания аннексином V и пропидий иодидом (рис. 3). В процессе апоптоза изменяется состав маркеров мембранны клеток. Одним из таких маркеров является фосфатидилсерин, с которым связывается аннексин в присутствии ионов кальция. Пропидий иодид является маркером некроза и попадает в мёртвые клетки вследствие изменения проницаемости мембранны. Пропидий иодид не способен окрашивать живые клетки и клетки в состоянии раннего апоптоза из-за наличия неповреждённой плазматической мембранны [38]. Для данного эксперимента были выбраны опухолевые клетки линии HCC-1954.

Как показано на рис. 3, клетки линии HCC-1954, обработанные SAHA/DOX, находятся в четырёх квадрантах (Q1, Q2, Q3 и Q4). Квадрант Q1 свидетельствует об окрашенных пропидий иодидом клетках, находящихся в состоянии некроза. К квадранту Q2 относятся клетки, находящиеся на стадии позднего апоптоза и окрашиваются как аннексином V, так и пропидий иодидом. В квадранте Q3 клетки окрашиваются только аннексином V и находятся в стадии раннего апоптоза. Неокрашенные клетки являются живыми и относятся к квадранту Q4 [38]. Показано, что SAHA и DOX по отдельности способны стимулировать гибель клеток посредством апоптоза (76,5% и 59,6% клеток находились в стадии позднего апоптоза, соответственно, квадрант Q2) (см. рис. 3, b, c). Комбинация SAHA/DOX в меньшей степени демонстрировала индукцию апоптоза в клетках (47,7%, квадрант Q2, рис. 3, d) по сравнению с препаратами по отдельности, однако индуцировала в большей степени некроз (35,2%, квадрант Q1),

по сравнению с SAHA (21,9%, квадрант Q1) и DOX (15,1%, квадрант Q1), что свидетельствует о синергизме действия разработанного соотношения препаратов, а также изменении типа программируемой гибели клеток при использовании комбинации SAHA/DOX. Для лучшей интерпретации полученных результатов требуется дальнейшее исследование механизмов клеточной гибели, вызываемых SAHA, DOX и их комбинацией.

Заключение

Использование комбинаций препаратов для лечения опухолевых заболеваний позволяет снизить дозы вводимых препаратов, уменьшить побочные эффекты и преодолеть лекарственную устойчивость опухолевых клеток. Применение модели Loewe и метода Чоу-Талалай может упростить поиск оптимальных соотношений веществ для исследований комбинаций различных препаратов *in vitro* и *in vivo*, использовать их для дальнейшей разработки новых носителей в качестве систем доставки или совместной инкапсуляции препаратов в микро- и наночастицы, а также для создания новых протоколов лечения опухолевых заболеваний. Расчёт индекса синергизма с помощью математической модели Loewe выявил синергетический эффект комбинаций SAHA и DOX в отношении HER2-положительного подтипа опухолевых линий клеток: HCC-1954, MCF-7/ADR и SKBR-3, а также аддитивный эффект в отношении линий MCF-7 и MDA-MB-231. На основе ИС были выбраны соотношения SAHA/DOX для каждого типа опухолевых клеток молочной железы, подтверждён их синергетический эффект с помощью метода Чоу-Талалай и рассчитано среднее оптимальное соотношение комбинации

SAHA/DOX. Полученная оптимальная комбинация SAHA/DOX (30:1) продемонстрировала высокую способность к активации программируемой гибели клеток линии НСС-1954. Таким образом, разработанная комбинация SAHA/DOX представляется перспективной схемой для лечения опухолей молочной железы, однако для подтверждения результатов *in vitro* необходимы дальнейшие исследования *in vivo*.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-25-00293, <https://rscf.ru/project/22-25-00293/>

Литература/References

1. Морозов Д.А., Колядинова И.В., Поддубная И.В. и др. Клинико-морфологические аспекты эффективности неоадьювантной химиотерапии у больных с агрессивным луминальным HER2-отрицательным раком молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2021; 17(4): 38–47. doi: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2021-17-4-38-47>. [Morozov D.A., Kolyadina I.V., Poddubnaya I.V., Ganshina I.P., Khokhlova S.V., Kometova V.V., Rodionov V.V. Clinical and morphological aspects of neoadjuvant chemotherapy efficacy in patients with aggressive luminal HER2-negative breast cancer. Tumors of the Female Reproductive System. 2021; 17 (4): 38–47. doi: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2021-17-4-38-47>. (in Russian)]
2. tass.ru [интернет]. Информационное агентство ТАСС [доступ от 15.10.2021]. Доступ по ссылке <https://n.tass.ru/obschestvo/12676163> [tass.ru [internet]. Informationsnöe agentstvo TASS [dostup ot 15.10.2021]. Dostup po ssylke <https://n.tass.ru/obschestvo/12676163>]
3. Fisusi E.A., Akala E.O. Drug combinations in breast cancer therapy. Pharma Nanotechnol. 2019; 7 (1): 3–23. doi: 10.2174/221173850766190122111224.
4. Dai X., Cheng H., Bai Z., Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. J Cancer. 2017; 8 (16): 3131. doi: 10.7150/jca.18457.
5. Wawruszak A., Borkiewicz L., Okon E., Kukula-Koch W., Afshan S., Halasa M., Vorinostat (SAHA) and breast cancer: an overview. Cancers. 2021; 13 (18): 4700. doi: 10.3390/cancers13184700.
6. Humphrey R.M., Brockway-Lunardi L.M., Bonk D.T., Dohoney K.M., Doroshow J.H., Meech S.J. et al. Opportunities and challenges in the development of experimental drug combinations for cancer. J Natl Cancer Inst. 2011; 103 (16): 1222–1226. doi: 10.1093/jnci/djr246.
7. Долгова Д.Р., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Генинг С.О., Антонеева И.И., Песков А.Б., Федотова А.Ю. Маркеры первичной химиорезистентности эпителиальных клеток асцита у больных раком яичников. Антибиотики и химиотер. 2019; 64 (5–6): 18–21. doi: <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10026>. [Dolgova D.R., Gening T.P., Abakumova T.V., Gening S.O., Antoneeva I.I., Peskov A.B., Fedotova A.Yu. Markers of primary chemoresistance of epithelial ascites cells in patients with ovarian cancer. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2019; 64 (5–6): 18–21. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10026>. (in Russian)]
8. Pellois D.S., Paula L.B., de Melo M.T., Tedesco A.C. Targeted and synergic glioblastoma treatment: multifunctional nanoparticles delivering verteporfin as adjuvant therapy for temozolamide chemotherapy. Mol Pharm. 2019; 16 (3): 1009–1024. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01001.
9. Куделькина В.В., Халанский А.С., Алексеева А.И., Гореликов П.Л., Косырева А.М. Комбинация наносомальной формы доксорубицина, интерферона альфа и нитроглицерина в терапии крыс Вистар с глиобластомой 101.8. Антибиотики и химиотер. 2021; 66 (9–10): 17–23. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-9-10-17-23>. [Kudelkina V.V., Khalansky A.S., Alekseeva A.I., Gorelikov P.L., Kosyрева A.M. Combination of nanosomal form of doxorubicin, interferon alpha, and nitroglycerin in the treatment of 101.8 glioblastoma in Wistar rats. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2021; 66 (9–10): 17–23. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-9-10-17-23>
10. Лебедев В.В., Новиков С.А., Рыбалкина Е.Ю., Заботина Т.Н. Гидрофильные регуляторные гексапептиды — ингибиторы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Антибиотики и химиотер. 2010; 55 (1–2): 3–5. [Lebedev V.V., Novikov S.A., Rybalkina E.Y., Zabotina T.N. Hydrophilic Regulator Hexapeptides as Inhibitors of Tumor Cell Multiple Drug Resistance. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2010; 55 (1–2): 3–5. (in Russian)]
11. Никольская Е.Д., Фаустова М.Р., Моллаев М.Д., Жунина О.А., Сокол М.Б., Яббаров Н.Г. и др. Разработка полимерной системы доставки даунорубицина в опухолевые клетки для преодоления лекарственной устойчивости. Известия Академии наук. Серия химическая. 2018; 4: 747–756. doi: <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2132-5>. [Nikolskaya E.D., Faustova M.R., Mollaev M.D., Zhunina O.A., Sokol M.B., Yabbarov N.G. et al. Development of a polymer system for the delivery of daunorubicin to tumor cells to overcome drug resistance. Russian Chemical Bulletin. 2018; 67: 747–756. doi: <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2132-5>. (in Russian)]
12. Congras A., Caillet N., Torosian N., Quelen C., Daugrois C., Brousset P. et al. Doxorubicin-induced loss of DNA topoisomerase II and DNMT1-dependent suppression of MiR-125b induces chemoresistance in ALK-positive cells. Oncotarget. 2018; 9 (18): 14539. doi: 10.18632/oncotarget.24465.
13. El-Gowily A.H., Loutfy S.A., Ali E.M., Mohamed T.M., Mansour M.A. Tioconazole and chloroquine act synergistically to combat doxorubicin-induced toxicity via inactivation of PI3K/AKT/mTOR signaling mediated ROS-dependent apoptosis and autophagic flux inhibition in MCF-7 breast cancer cells. Pharmaceuticals. 2021; 14 (3): 254. doi: 10.3390/ph14030254.
14. Guo C., Wang Q., Zhang X., Lu F., Sun M., Zeng P. et al. Gelated Vorinostat with inner-lysosome triggered release for tumor-targeting chemotherapy. Colloids Surf B: Biointerfaces. 2020; 194: 111144. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111144.
15. Miyamoto K., Watanabe M., Boku S., Sukeno M., Morita M., Kondo H. et al. xCT inhibition increases sensitivity to vorinostat in a ROS-dependent manner. Cancers. 2020; 12 (4): 827. doi: 10.3390/cancers12040827.
16. Leone A., Roca M.S., Ciardiello C., Terranova-Barberio M., Vitagliano C., Ciliberto G. et al. Vorinostat synergizes with EGFR inhibitors in NSCLC cells by increasing ROS via up-regulation of the major mitochondrial porin VDAC1 and modulation of the c-Myc-NRF2-KEAP1 pathway. Free Radic Biol Med. 2015; 89: 287–299. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.155.
17. Shim G.S., Manandhar S., Shin D.H., Kim T.H., Kwak M.K. Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. Free Radic Biol Med. 2009; 47 (11): 1619–1631. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.006.
18. Lee S.J., Hwang S.O., Noh E.J., Kim D.U., Nam M., Kim J.H. et al. Transactivation of bad by vorinostat-induced acetylated p53 enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in cervical cancer cells. Exp Mol Med. 2014; 46 (2): e76–e76. doi: 10.1038/emm.2013.149.
19. Zheng X., Naiditch J., Czurylo M., Jie C., Lautz T., Clark S. et al. Differential effect of long-term drug selection with doxorubicin and vorinostat on neuroblastoma cells with cancer stem cell characteristics. Cell Death Dis. 2013; 4 (7): e740–e740. doi: 10.1038/cddis.2013.264.
20. Lautz T.B., Jie C., Clark S., Naiditch J.A., Jafari N., Qiu, Y.Y. et al. The effect of vorinostat on the development of resistance to doxorubicin in neuroblastoma. PLoS One. 2012; 7 (7): e40816. doi: 10.1371/journal.pone.0040816.
21. Pettke A., Hotfilder M., Clemens D., Klco-Brosius S., Schaefer C., Potratz J., Dirksen U. Suberanilohydroxamic acid (vorinostat) synergistically enhances the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in osteosarcoma cell lines. Anticancer Drugs. 2016; 27 (10): 1001–1010. doi: 10.1097/CAD.0000000000000418.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Моллаева М. Р. — анализ и интерпретация результатов, написание текста; Яббаров Н. Г. — постановка проблемы, написание и редактирование текста; Сокол М. Б. — выполнение методик, интерпретация результатов; Чиркина М. В. — выполнение методик, анализ результатов; Никольская Е. Д. — постановка проблемы, написание, редактирование и финальное утверждение текста.

22. Patra S, Praharaj PP, Klionsky DJ, Bhutia S.K. Vorinostat in autophagic cell death: a critical insight into autophagy-mediated, -associated and -dependent cell death for cancer prevention. *Drug Discov Today*. 2022; 27 (1): 269–279. doi: 10.1016/j.drudis.2021.08.004.
23. Mollaeva M.R., Yabbarov N., Sokol M., Chirkina M., Mollaev M.D., Zabolotskii A., et al. Optimization, Characterization and Pharmacokinetic Study of Meso-Tetraphenylporphyrin Metal Complex-Loaded PLGA Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (22): 12261. doi: 10.3390/ijms222212261.
24. Zheng S., Wang W., Aldahdooh J., Malyutina A., Shadbahr T., Tanoli Z., et al. SynergyFinder Plus: Toward Better Interpretation and Annotation of Drug Combination Screening Datasets. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2022; 20 (3): 587–596. doi: 10.1016/j.gpb.2022.01.004.
25. Pawar A. Classification of breast cancer cell lines into subtypes based on genetic profiles [dissertation]. School of Informatics: Indiana University; 2015. Available from: <https://scholarworks.iupui.edu/handle/1805/7912>.
26. Jin Y., Zhang W., Wang H., Zhang Z., Chu C., Liu X., Zou Q. EGFR/HER2 inhibitors effectively reduce the malignant potential of MDR breast cancer evoked by P-gp substrates *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Reports*. 2016; 35 (2): 771–778. doi: 10.3892/or.2015.4444.
27. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of cell viability by the alamarblue assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018; 2018 (6): pdb-prot095489. doi: 10.1101/pdb.prot095489.
28. synergyfinder.org [internet]. SynergyFinder — User Documentation [cited 2022 August 7]. Available from: <https://synergyfinder.fimm.fi/synergy/syndocs/>.
29. Yadav B., Wennerberg K., Aittokallio T., Tang J. Searching for drug synergy in complex dose-response landscapes using an interaction potency model. *Comput Struct Biotechnol J.* 2015; 13: 504–513. doi: 10.1016/j.csbj.2015.09.001.
30. Miladiyah I., Yuanita E., Nuryadi S., Jumina J., Haryana S.M., Mustafa M. Synergistic effect of 1, 3, 6-trihydroxy-4, 5, 7-trichloroxanthone in combination with doxorubicin on b-cell lymphoma cells and its mechanism of action through molecular docking. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2020; 92: 100576. doi: 10.1016/j.curtheres.2020.100576.
31. Alsherbiny M.A., Bhuyan D.J., Low M.N., Chang D., Li C.G. Synergistic interactions of cannabidiol with chemotherapeutic drugs in mcf7 cells: Mode of interaction and proteomics analysis of mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (18): 10103. doi: 10.3390/ijms221810103.
32. He L., Kulesskiy E., Saarela J., Turunen L., Wennerberg K., Aittokallio T., Tang J. *Cancer systems biology*. New York: Humana press; 2018; 351–398. doi: 10.1007/978-1-4939-7493-1_17.
33. Ramaswamy B., Sparano J.A. Targeting epigenetic modifications for the treatment and prevention of breast cancer. *Curr Breast Cancer Rep.* 2010; 2 (4): 198–207. doi: <https://doi.org/10.1007/s12609-010-0027-z>.
34. Lai C.J., Bao R., Tao X.U., Wang J., Atoyan R., Qu H., et al. CUDC-101, a multitargeted inhibitor of histone deacetylase, epidermal growth factor receptor, and human epidermal growth factor receptor 2, exerts potent anticancer activity. *Cancer Res.* 2010; 70 (9): 3647–3656. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3360.
35. Jenie R.I., Handayani S., Susidarti R.A., Udin L.Z., Meiyanto E. The cytotoxic and antimigratory activity of Brazilin-doxorubicin on MCF-7/HER2 cells. *Ad Pharm Bull.* 2018; 8 (3): 507. doi: 10.15171/apb.2018.059.
36. Tang F., Choy E., Tu C., Horneck F., Duan Z. Therapeutic applications of histone deacetylase inhibitors in sarcoma. *Cancer Treat Rev.* 2017; 59: 33–45. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.06.006.
37. Sampson E.R., Amin V., Schwarz E.M., O'Keefe R.J., Rosier R.N. The histone deacetylase inhibitor vorinostat selectively sensitizes fibrosarcoma cells to chemotherapy. *J Orthop Res.* 2011; 29 (4): 623–632. doi: 10.1002/jor.21274.
38. Malik M.A., Lone S.A., Wani M.Y., Talukdar M.I.A., Dar O.A., Ahmad A., Hashmi A.A. S-benzylidithiocarbazate imine coordinated metal complexes kill *Candida albicans* by causing cellular apoptosis and necrosis. *Bioorg Chem.* 2020; 98: 103771. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.103771.

Информация об авторах

Моллаева Мария Романовна — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-9999-4652. eLIBRARY SPIN-код: 9579-4687. Scopus Author ID: 57201648257.

Яббаров Никита Григорьевич — к. б. н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-3361-9136. eLIBRARY SPIN-код: 7024-9726. Scopus Author ID: 50462552500.

Сокол Мария Борисовна — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-1976-1972. eLIBRARY SPIN-код: 5916-1653. Scopus Author ID: 57195755669.

Чиркина Маргарита Викторовна — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-6061-4803. eLIBRARY SPIN-код: 4428-7810. Scopus Author ID: 57196439676.

Никольская Елена Дмитриевна — к. х. н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-1931-3117. eLIBRARY SPIN-код: 8108-6572. Scopus Author ID: 57189605012.

About the authors

Mariia R. Mollaeva — junior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9999-4652. eLIBRARY SPIN code: 9579-4687. Scopus Author ID: 57201648257.

Nikita G. Yabbarov — Ph. D. in Biology, senior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID 0000-0003-3361-9136. eLIBRARY SPIN code: 7024-9726. Scopus Author ID: 50462552500.

Mariya B. Sokol — junior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1976-1972. eLIBRARY SPIN code: 5916-1653. Scopus Author ID: 57195755669.

Margarita V. Chirkina — junior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6061-4803. eLIBRARY SPIN: 4428-7810. Scopus Author ID: 57196439676.

Elena D. Nikolskaya — Ph. D. in Chemistry, senior researcher at the Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1931-3117. eLIBRARY SPIN code: 8108-6572. Scopus Author ID: 57189605012.

Влияние полиморфизма гена *MDR1 (ABCB1)* на риск развития гепатотоксических реакций у больных туберкулёмом лёгких

*М. А. АЛЫМЕНКО^{1,2,5}, Р. Ш. ВАЛИЕВ¹, Н. Р. ВАЛИЕВ¹, И. Н. ТРАГИРА³,
А. В. ПОЛОНИКОВ⁴, Н. П. БАЛОБАНОВА⁵, А. В. БАТИЩЕВ⁵, В. М. КОЛОМИЕЦ⁴,
Г. С. МАЛЬ⁴, С. Н. ВОЛКОВА⁶, В. В. КОЗЛОВ⁷, Е. И. СУСЛИКОВА⁸, Е. В. ПОПОВА⁹

¹ Курская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Казань, Россия

² ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных болезней» Минздрава России, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава России, Курск, Россия

⁵ НОУ ВО «Московский финансово-промышленный университет «Синергия», Москва, Россия

⁶ ФГБОУ ВО «Курская государственная сельскохозяйственная академия им. Иванова», Курск, Россия

⁷ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова», Москва, Россия

⁸ ОБУЗ «Областной клинический противотуберкулёзный диспансер», Курск, Россия

⁹ БУЗ ВО Областная детская клиническая больница № 2, Воронеж, Россия

The effect of Polymorphism of the *MDR1 (ABCB1)* Gene on the Risk of Hepatotoxic Reactions in Patients with Pulmonary Tuberculosis

*MAXIM A. ALYMENTKO^{1,2,5}, RAVIL SH. VALIEV¹, NAIL R. VALIEV¹, IRINA N. TRAGIRA³,
ALEXEY V. POLONIKOV⁴, NATALYA P. BALOBANOVA⁵, ALEXANDER V. BATISHCHEV⁵,
VLADISLAV M. KOLOMIETS⁴, GALINA S. MAL⁴, SVETLANA N. VOLKOVA⁶,
VASILII V. KOZLOV⁷, ELENA I. SUSLIKOVА⁸, ELIZAVETA V. POPOVA⁹

¹ Kazan State Medical Academy — Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH, Kazan, Russia

² Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia

⁵ Moscow Financial and Industrial University «Synergy», Moscow, Russia

⁶ Kursk State Agricultural Academy named after Ivanova, Kursk, Russia

⁷ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

⁸ Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, Kursk, Russia

⁹ Regional Children's Clinical Hospital No. 2, Voronezh, Russia

Резюме

В последнее время отмечается снижение эффективности лечения больных туберкулёмом из-за появления нежелательных реакций на противотуберкулёзные лекарственные препараты. Особенную большую роль в проведении противотуберкулёзной терапии играют гепатотоксические реакции, и врачу фтизиатру нередко приходится сталкиваться с отменой ряда противотуберкулёзных препаратов. Цель исследования — исследовать взаимосвязь полиморфных вариантов генов ферментов метаболизма биотрансформации ксенобиотиков (NAT2 (590G>A (rs1799930), CYP2E1 (9896C>G (rs2070676), ABCB1 (3435T>C (rs1045642), GSTM1 (E/D), GSTT1 (E/D) с риском развития гепатотоксических реакций у больных туберкулёмом лёгких. Методы исследования. Для прогнозирования вероятности возникновения гепатотоксических реакций при проведении специфической противотуберкулёзной терапии использовался метод логистического регрессионного анализа. Результаты. Была получена 1 статистически значимая модель, которая отражает ассоциацию с гепатотоксическими реакциями на противотуберкулёзные препараты генотипов ТС или ТС гена (аллель Т) ABCB1 (rs1045642). Заключение. Таким образом, фармакогенетическое тестирование, использованное в нашем исследовании, позволяет выявить группы риска больных туберкулёмом лёгких по вероятности возникновения гепатотоксических реакций, что возможно в будущем обеспечит индивидуализированный подход к лечению данных пациентов.

Ключевые слова: ферменты биотрансформации ксенобиотиков; побочное действие противотуберкулёзных препаратов; гепатотоксичность; метод логистического регрессионного анализа

Для цитирования: Альменко М. А., Валиев Р. Ш., Валиев Н. Р., Трагира И. Н., Полоников А. В., Маль Г. С., Волкова С. Н., Козлов В. В., Сусликова Е. И., Попова Е. В. Влияние полиморфизма гена *MDR1 (ABCB1)* на риск развития гепатотоксических

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Муштари, д. 11, КГМА, г. Казань, Россия, 420012. E-mail: maxim.alymentko@gmail.com

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 11 Mushtari st., Kazan State Medical Academy, Kazan, 420012 Russia.
E-mail: maxim.alymentko@gmail.com

реакций у больных туберкулёзом лёгких. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68: 7–8: 62–69. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-62-69>.

Abstract

Currently, a decrease is seen in the effectiveness of treatment in patients with tuberculosis due to the appearance of adverse reactions to anti-tuberculosis drugs. Hepatotoxic reactions play an especially important role in anti-tuberculosis therapy, and phthisiologists often have to deal with the cancellation of a number of anti-tuberculosis drugs. The aim of the study was to investigate the relationship of polymorphic gene variants of xenobiotic biotransformation metabolizing enzymes (NAT2 (590G>A (rs1799930), CYP2E1 (9896C>G (rs2070676), ABCB1 (3435T>C (rs1045642), GSTM1 (E/D), GSTT1 (E/D) with the risk of hepatotoxic reactions in patients with pulmonary tuberculosis. *Material and methods.* The logistic regression analysis method was used to predict the probability of hepatotoxic reactions during specific anti-tuberculosis therapy. Results: 1 statistically significant model was obtained, which reflects the association with hepatotoxic reactions to anti-tuberculosis drugs of the TS genotypes or the TS gene (T allele) ABCB1 (rs1045642). *Conclusion.* Pharmacogenetic testing used in the study allows us to identify risk groups of patients with pulmonary tuberculosis according to the likelihood of hepatotoxic reactions, which may provide an individualized approach to the treatment of these patients in the future.

Keywords: Enzymes of xenobiotic biotransformation; side effect of anti-tuberculosis drugs; hepatotoxicity; logistic regression analysis method

For citation: Alymenko M. A., Valiev R. Sh., Valiev N. R., Tragira I. N., Polonikov A. V., Mal G. S., Volkova S. N., Kozlov V. V., Suslikova E. I., Popova E. V. The effect of Polymorphism of the MDR1 (ABCB1) Gene on the risk of Hepatotoxic Reactions in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Antibiotiki i Khimioter.* = *Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68: 7–8: 62–69. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-62-69>.

Введение

Эпидемическая ситуация по туберкулёзу в настоящее время стабилизирована благодаря усилиям ряда структур, а также внедрению современных методов диагностики и лечения, повышения информированности населения, своевременного выявления и диагностики туберкулёза лёгких в общеврачебной сети, работе врачей-фтизиатров в очагах туберкулёза и т. д. [1–3].

В последнее время отмечается снижение эффективности лечения больных туберкулёзом из-за появления нежелательных реакций на противотуберкулёзные лекарственные препараты. Особенную большую роль в проведении противотуберкулёзной терапии играют гепатотоксические реакции и врачу фтизиатру нередко приходится сталкиваться с отменой ряда противотуберкулёзных препаратов и их заменой на менее эффективные и более дорогостоящие резервные [4]. Это приводит к увеличению сроков бактериоудаления и длительности химиотерапии. В случае отсутствия лекарственной устойчивости на препараты 1 ряда в схему лечения включаются изониазид и рифампицин как наиболее эффективные [4].

Следует отметить, что при лечении больных туберкулёзом используется комплексная противотуберкулёзная терапия, включающая несколько специфических препаратов, и выявить на какой именно препарат возникли нежелательные реакции, достаточно сложно.

В настоящее время известно, что фармакокинетика изониазида и рифампицина взаимосвязана с фенотипом ацетилирования [3, 4]. Высокая концентрация в крови характерна для медленных ацетилиаторов, низкая — для быстрых [5].

Метаболизм противотуберкулёзных препаратов функционирует благодаря ацетилированию (NAT2), окислению (CYP2E1) и конъюгации (GST) [6].

Ген *ABCB1* (MDR1) расположен в локусе 7q21.12 и состоит из 29 экзонов. Р-гликопротеин является АТФ-зависимым мембранным транспортером, обеспечивающим экспорт ксенобиотиков из клеток [7].

Аденозинтрифосфат (АТФ) — связывающая кассета B1 (*ABCB1*) является мембранным транспортером, который кодируется геном *ABCB1*, играет важную роль в АТФ-зависимом поглощении и выведении внеклеточных соединений и ксенобиотиков в клетки и из клеток [8, 9].

В настоящее время наиболее изученным является полиморфизм C 3435T гена *ABCB1*. В результате мутаций данного гена происходит уменьшение экспрессии гликопротеина Р на поверхности клетки, что проявляется нарушением выведения лекарственных средств [10].

Полиморфизмы *ABCB1* определяют фактор риска, эффективность и токсичность некоторых методов лечения. В частности, ген *ABCB1* C1236T (rs1128503) и/или C3435T (rs1045642) вовлечён в такие заболевания, как туберкулёз, рак, незначительный ишемический инсульт, хроническое заболевание печени и психическое здоровье [11–12].

Таким образом, на сегодняшний день сведения о влиянии полиморфизмов генов *ABCB1* на эффективность противотуберкулёзной терапии противоречивы, что диктует необходимость проведения исследований в данном направлении, которые обеспечат персонализированный подход к лечению больных туберкулёзом лёгких.

Цель исследования — исследовать взаимосвязь полиморфных вариантов генов ферментов метаболизма биотрансформации ксенобиотиков

(*NAT2* (590G>A (rs1799930), *CYP2E1* (9896C>G (rs2070676), *ABCB1* (3435T>C (rs1045642), *GSTM1* (E/D), *GSTT1* (E/D) с риском развития гепатотоксических реакций у больных туберкулозом лёгких.

Материал и методы

Группа исследования представлена 212 впервые выявленными больными туберкулозом лёгких в возрасте от 18 до 65 лет, получающих интенсивную фазу химиотерапии. Критериями исключения из исследования явились — пациенты с тяжёлыми сопутствующими заболеваниями (злокачественные новообразования, системные заболевания кровеносной системы, сердечно-лёгочная и почечная недостаточность в стадии декомпенсации, резкое истощение, анемия, тиреотоксикоз, психические заболевания).

В исследовании преобладали лица мужского пола — 165 (77,8%) человек. Средний возраст больных, включённых в исследование, составил 46,4 года.

Лекарственные препараты изониазид, рифампицин, этамбутол и паразинамид были включены в схемы лечения больных туберкулозом лёгких.

В группе исследования преобладал инфильтративный туберкулоз лёгких, который установлен в 40,3% наблюдений. На втором месте диагностировался диссеминированный туберкулоз — 35,2%, в 19,7% случаев определяли фиброзно-кавернозный и в 4,8% — очаговый туберкулоз лёгких.

Эти 212 пациентов были разделены на группы в зависимости от наличия или отсутствия гепатотоксических реакций у больных туберкулозом лёгких: 86 пациенты имели гепатотоксические реакции на противотуберкулёзные препараты, у 126 пациентов — данные реакции отсутствовали.

Переносимость специфической химиотерапии оценивали по клинической картине гепатотоксических реакций и лабораторным показателям (содержание АЛТ и АСТ, уровень билирубина).

Генотипирование пациентов туберкулозом лёгких проводилось в иммуногенетической лаборатории ООО «Томограф» (г. Курск).

Для проведения молекулярно-генетических исследований у 212 человек была взята из вены цельная кровь в пробирку с ЭДТА. Выделение геномной ДНК осуществляли с помощью наборов реагентов Arrow Blood DNA 500 из цельной крови (на станции NorDiag Arrow). Далее проводили постановку полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием наборов реагентов для генотипирования SNPs: (*NAT2* (590G>A (rs1799930), *CYP2E1* (9896C>G (rs2070676), *ABCB1* (3435T>C (rs1045642), *GSTM1* (E/D), *GSTT1* (E/D).

Постановка проводилась согласно протоколу производителя реагентов. Контроль качества результатов генотипирования осуществляли путём случайного «слепого» отбора 212 пациентов и повторного генотипирования отобранных образцов ДНК по исследуемым полиморфным вариантам генов методом ПЦР-РВ (по 1-й ПЦР-плашке для каждого SNP). Сопоставление данных первичного и «контрольного» генотипирования показало 100% воспроизводимость результатов.

На первом этапе исследования изучалась частота и степень выраженности гепатотоксических реакций на противотуберкулёзные препараты, а также определение мутаций в олигонуклеотидных последовательностях генов кандидатов и поиск корреляционных связей между генотипом пациента и частотой гепатотоксических нежелательных побочных реакций.

На втором этапе проводился поиск ассоциаций генов ФБК с наличием гепатотоксических реакций методом отношения шансов.

На третьем этапе проводилось построение моделей логистической регрессии с поочерёдным включением каждого

предиктора. Построение логистической регрессионной модели осуществляли методом пошагового включения прогностических факторов с оценкой значения коэффициента детерминации R², показывающего долю влияния всех предикторов модели на дисперсию зависимой переменной.

Проверка статистической значимости модели осуществлялась при помощи критерия χ^2 . При значении $p < 0,05$ гипотеза о незначимости модели отвергалась.

Соответствие модели использованным данным характеризовали с помощью критерия согласия Хосмера-Лемешева. При $p > 0,05$ принималась гипотеза о согласованности модели. Интерпретация параметров логистической регрессии производилась на основе величины $\exp(b)$. При положительном коэффициенте b , $\exp(b)$ больше 1, что указывает на повышение шансов наступления прогнозируемого события. Если коэффициент b отрицательный, $\exp(b)$ меньше 1, то шансы наступления события снижаются.

Чувствительность и специфичность предикторов оценивали при помощи ROC-анализа. Количественная интерпретация результатов проводилась по ROC-кривым с оценкой показателя AUC.

Уравнение логистической регрессии:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 x_1 + \dots + b_n x_n)}}$$

где p — вероятность прогнозируемого события; e — основание натурального логарифма (2,72); b_0 — константа модели; b_1 — коэффициент при предикторной переменной x_1 , показывающий изменение логарифмических шансов, вызванное единичным изменением независимых переменных; n — порядковый номер предиктора, включённого в уравнение.

Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием программных пакетов SPSS Statistica 26.

Результаты исследования

В ходе проведённого исследования гепатотоксические реакции отмечались у 86 впервые выявленных больных туберкулозом лёгких (40,6%) до 1 мес. от начала лечения. Среди мужчин частота гепатотоксических реакций составила 83,3%, у женщин — 16,7%. У 10,24% пациентов гепатотоксические реакции отмечались в виде повышения уровня АЛТ и АСТ в 2 и более раза.

Гепатотоксические реакции у 86,5% пациентов купировались дополнительным назначением гепатопротекторов и не потребовали отмены противотуберкулёзных препаратов. У 3,48% пациентов гепатотоксические реакции потребовали отмены рифампицина и (или) изониазида, изменения схемы лечения и назначения гепатопротекторов. В качестве гепатопротекторов использовали Карсил (МНН — расторопши пятнистой плодов экстракт), Лив52, Ремаксол (инозин + меглюмин + метионин + никотинамид + янтарная кислота), препараты урсодезоксихолевой кислоты, Эсенциале, Фосфоглив (фосфолипиды + глицериновая кислота).

В ходе проведённого исследования на первом этапе был проведён поиск корреляционных связей полиморфизмов генов ФБК с гепатотоксическими реакциями у больных туберкулозом лёгких (табл. 1).

Таблица 1. Корреляционные взаимосвязи полиморфизмов генов ФБК с наличием гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких**Table 1. Correlation between polymorphisms of the xenobiotic biotransformation enzyme genes and the presence of hepatotoxic reactions in patients with pulmonary tuberculosis**

Генотипы (аллели)	Корреляционная связь
<i>GSTM</i> (1-EE, 2-DD)	-0,024
<i>GSTT</i> (1-DD, 2-EE)	+0,026
<i>NAT2</i> (1-GG, 2-GA, 3-AA)	+0,23*
<i>ABCB1</i> (1-TT, 2-TC, 3-CC)	+0,10*
<i>CYP2E1</i> (1-CC, 2-CG, 3-GG)	+0,106
<i>ABCB1</i> (C)	+0,099
<i>ABCB1</i> (T)	+0,313*
<i>NAT2</i> (G)	-0,027
<i>NAT2</i> (A)	+0,040

Примечание.* — $p < 0,05$.**Note.*** — $P < 0,05$.

Проведённый корреляционный анализ показал, что отмечается статистически значимая слабая корреляционная связь полиморфизма гена *NAT2* (590G>A (rs1799930), *ABCB1* (3435T>C (rs1045642), а также аллеля гена *ABCB1* (T) с наличием гепатотоксических реакций — (+0,23, +0,1 и +0,313), соответственно (см. табл. 1). По другим полиморфизмам генов ФБК также были выявлены корреляционные связи с наличием гепатотоксических реакций, однако они носили очень слабый корреляционный характер и были статистически не значимы (см. табл. 1).

На втором этапе исследования был проведён анализ ассоциаций полиморфизмов генов ФБК с наличием гепатотоксических реакций в рамках модели кодоминирования и доминирования (табл. 2).

Таблица 2. Ассоциация генотипов ФБК с наличием гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких**Table 2. Association of xenobiotic biotransformation enzyme genotypes with the presence of hepatotoxic reactions in patients with pulmonary tuberculosis**

Ген	Однонуклеотидный полиморфизм	Генотипы	Частоты генотипов, <i>n</i> (%)		<i>P</i> -уровень	OR (95%CI) ¹		
			Наличие гепатотоксических реакций					
			N	%				
<i>GSTM1</i>	E/D	<i>EE</i>	40	46,5	0,07	1,00		
		<i>DD</i>	46	53,5				
<i>GSTT1</i>	E/D	<i>EE</i>	75	87,2	0,74	1,00		
		<i>DD</i>	11	12,8				
<i>NAT2</i>	590G>A (rs1799930)	<i>GG</i>	34	39,5	0,039	1,00		
		<i>GA</i>	45	52,3				
		<i>AA</i>	7	8,1				
<i>CYP2E1</i>	9896C>G (rs2070676)	<i>CC</i>	79	91,9	0,64	1,00		
		<i>CG</i>	7	8,1				
		<i>GG</i>	0	0				
<i>ABCB1</i>	3435T>C (rs1045642)	<i>TT</i>	13	15,1	0,0001	1,00		
		<i>TC</i>	53	61,6				
		<i>CC</i>	20	23,3				

Примечание.¹ Отношения шансов и 95% доверительные интервалы для ассоциаций генотипов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития лёгочного туберкулёза (кодоминантная модель).

Note.¹ Odds ratios and 95% confidence intervals for associations of genotypes of xenobiotic biotransformation enzymes with risk of development.

В рамках модели кодоминирования (см. табл. 2) были получены статистически значимые ассоциации генотипов *TC* гена *ABCB1* (3435T>C (rs1045642)) и *GA* гена *NAT2* (590G>A (rs1799930)) в 61,6 и 52,3%, соответственно, с наличием гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких ($p < 0,0001$; $p = 0,039$). По другим полиморфизмам генов ФБК также были выявлены ассоциативные связи с наличием гепатотоксических реакций, однако они не носили статистически значимый характер (см. табл. 2).

В рамках модели доминирования была получена статистически значимая ассоциация генотипов «*TT+CC*» гена *ABCB1* (3435T>C (rs1045642)) с наличием гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких в 61,6% ($p < 0,01$) (табл. 3).

Следует отметить, что полиморфизм гена *ABCB1* (3435T>C (rs1045642)) статистически значимо коррелирует и ассоциируется с наличием гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких в рамках модели кодоминирования и доминирования, представлялось интересным построить логистическую регрессионную модель для данного полиморфизма, отражающую ассоциацию к гепатотоксическим реакциям на противотуберкулёзные препараты.

В ходе проведения логистического регрессионного анализа была получена 1 статистически значимая модель.

$$p = \frac{1}{1 + e^{(-1,003 + 0,564x)}}$$

где p — вероятность появления нежелательных реакций; x — генотип *TT* или *TC* гена *ABCB1*

Таблица 3. Ассоциация генотипов ФБК с наличием гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких в рамках модели доминирования

Table 3. Association of xenobiotic biotransformation enzyme genotypes with the presence of hepatotoxic reactions in patients with pulmonary tuberculosis within the framework of the dominance model

Ген	Однонуклеотидный полиморфизм	Генотипы	Частоты генотипов, n (%)				P-уровень	OR (95%CI) ¹		
			Наличие гепатотоксических реакций		Отсутствие гепатотоксических реакций					
			N	%	N	%				
<i>ABCB1</i>	3435T>C (rs1045642)	TC	53	61,6	55	43,7	0,01	1,0		
		TT+CC	33	38,4	71	56,3				
<i>NAT2</i>	590G>A (rs1799930)	GA	45	52,3	70	55,6	0,64	1,0		
		DD	11	12,8	13	10,3				

Примечание. ¹ Отношения шансов и 95% доверительные интервалы для ассоциаций генотипов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития.

Note. ¹ Odds ratios and 95% confidence intervals for associations of genotypes of xenobiotic biotransformation enzymes with risk of development.

Таблица 4. Регрессионная модель формирования гепатотоксических реакций в зависимости от наличия генотипов TT или TC гена *ABCB1*

Table 4. Regression model of the formation of hepatotoxic reactions depending on the presence of TT or TS genotypes of the *ABCB1* gene

Предикторы	Коэффициент регрессии (b)	Стд. ошибка	Статистика Вальда χ^2	Значимость (p)	OR	95% Доверительный интервал для OR	
						Нижняя	Верхняя
<i>ABCB1</i> (T) (генотипы TT или TC)	0,564	0,281	4,037	0,045	1,758	1,014	3,049
Константа	-1,003	0,249	16,204	<0,001	0,367		

(есть — 1, нет — 0). Модель является статистически значимой ($p=0,040$; $\chi^2=4,227$).

Данная модель отражает ассоциацию с гепатотоксичностью противотуберкулёзных препаратов генотипов *TC* или *TT* гена (аллель *T*) (*ABCB1*) (rs1045642) (табл. 4).

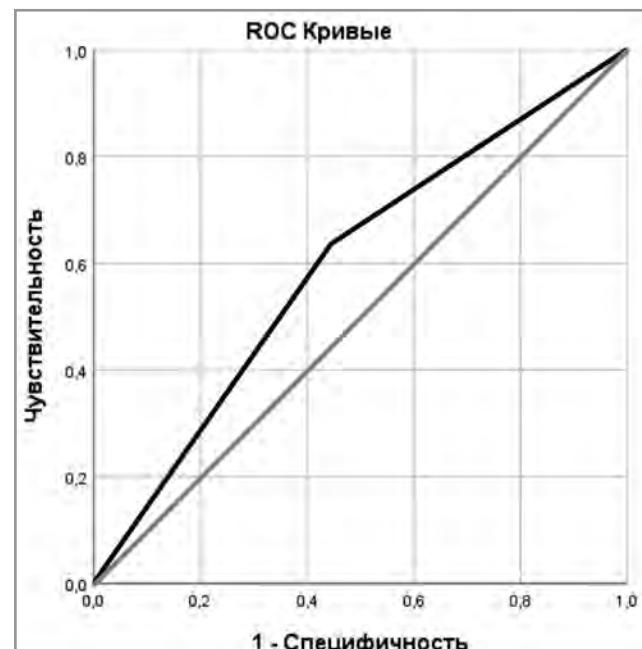
Специфичность модели — 100%, общее число корректных предсказаний — 63,9%. Показатель AUC = $0,596 \pm 0,032$, $p=0,004$ (рисунок).

В ходе построенной логистической регрессионной модели было выявлено, что наличие генотипов *TT* или *TC* (аллель *T*) гена *ABCB1* (3435T>C (rs1045642)) статистически значимо увеличивает риск гепатотоксических реакций при приёме противотуберкулёзных препаратов.

Обсуждение

В настоящее время отмечается большое число гепатотоксических реакций у больных с впервые выявленным туберкулёзом лёгких на противотуберкулёзные препараты, что безусловно требует отмены препаратов первого ряда, особенно рифампицина и изониазида.

Отмена данных препаратов приводит к удлинению сроков проведения интенсивной фазы химиотерапии, включению менее эффективных противотуберкулёзных препаратов, таких как парааминосалициловая кислота (ПАСК), тиацетазона и других, и возможным формированием лекарственной устойчивостью на противотуберку-



ROC-кривая логистической регрессионной модели развития гепатотоксических реакций в зависимости от наличия генотипов *TT* или *TC* гена *ABCB1*.

ROC curve of a logistic regression model for the development of hepatotoxic reactions depending on the presence of *TT* or *TS* genotypes of the *ABCB1* gene.

лёгные препараты. В настоящее время назначение противотуберкулёзных препаратов больным туберкулёзом происходит на основе массы пациента,

без учёта степени ацетилирования и генотипа ферментов биотрансформации ксенобиотиков, что ведёт порой у медленных ацетилияторов к появлению побочных реакций на противотуберкулёзные препараты, а у быстрых — к формированию лекарственной устойчивости и снижению эффективности лечения. Всё вышеизложенное свидетельствует о необходимости назначения противотуберкулёзных препаратов, исходя из результатов фармакогенетического тестирования пациентов.

Р-гликопротеин является продуктом гена *MDR1* и осуществляют транспорт веществ из клетки, физиологическая роль которого заключается в защите клеток от токсических соединений, однако функциональная и клиническая значимость вариантов полиморфизмов этого гена до конца не понята.

В настоящее время недостаточно изучены механизмы, снижающие накопление противотуберкулёзных препаратов в области туберкулёзного воспаления за счёт активности специальных белков-экспортёров клеток организма человека. Особую роль среди таких белков-экспортёров играют «белки множественной лекарственной устойчивости» и их наиболее яркий представитель — Р-гликопротеин, кодируемый геном *MDR1* [13].

Таким образом, полиморфизмы генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков влияют на активность данных ферментов и выведение препаратов из организма. Фармакогенетическое тестирование, использованное в нашем исследовании, позволяет выявить группы риска больных туберкулёзом лёгких по вероятности возникновения гепатотоксических реакций, что возможно в будущем обеспечит индивидуализированный подход к лечению данных пациентов и станет предметом наших дальнейших исследований.

Выводы

1. В ходе проведённого исследования гепатотоксические реакции отмечались у 86 впервые выявленных больных туберкулёзом лёгких (40,6%) до 1 месяца от начала лечения. Среди мужчин частота гепатотоксических реакций составила 83,3%, у женщин — 16,7%.

2. 3,48% пациентов с гепатотоксическими реакциями потребовали отмены рифампицина и (или) изониазида, изменения схемы лечения и назначения гепатопротекторов.

3. Установлена статистически значимая слабая корреляционная связь полиморфизма гена *NAT2* (590G>A (rs1799930), *ABCB1* (3435T>C

Литература/References

1. Афанасьев Е.И., Русских О.Е. Современные тенденции в эпидемиологии туберкулёза и ВИЧ-инфекции в мире и в Российской Федерации. Российский международный журнал. 2021;3: 24–26. [Afanashev E.I., Russkikh O.E. Modern trends in the epidemiology of tuberculosis and HIV infection in the world and in the Russian Federation. Russian International Journal. 2021; 3: 24–26. (in Russian)]
2. Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е. и др. Глобальные отчёты Всемирной организации здравоохранения по туберкулёзу. Формирование и интерпретация. Туберкулёз и болезни лёгких.

(rs1045642), а также аллеля гена *ABCB1* (*T*) с наличием гепатотоксических реакций — (+0,23, +0,1 и +0,313), соответственно.

4. Были выявлены корреляционные связи с наличием гепатотоксических реакций по другим полиморфизмам генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков, однако они носили очень слабый корреляционный характер и были статистически не значимы.

5. В рамках модели кодоминирования были получены статистически значимые ассоциации генотипов ТС гена *ABCB1* (3435T>C (rs1045642)) и GA гена *NAT2* (590G>A (rs1799930)) в 61,6 и 52,3%, соответственно, с наличием гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких ($p<0,0001$; $p=0,039$).

6. По другим полиморфизмам генов ФБК также были выявлены ассоциативные связи с наличием гепатотоксических реакций, однако они не носили статистически значимый характер.

7. В рамках модели доминирования была получена статистически значимая ассоциация генотипов «*TT+CC*» гена *ABCB1* (3435T>C (rs1045642)) с наличием гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом лёгких в 61,6% ($p<0,01$).

8. Обнаружены ассоциативные связи с наличием гепатотоксических реакций по другим полиморфизмам генов ферментов биотрасформации ксенобиотиков, однако они не носили статистически значимый характер

9. На основе построения логистической регрессионной модели выявлено, что риск развития гепатотоксических реакций на противотуберкулёзные препараты статистически значимо связан с генотипами ТС и *TT* (аллель *T*) гена *ABCB1* 3435T>C (rs1045642).

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов, которые могут повлиять на результаты или интерпретацию их рукописи.

Участие авторов. Концепция, дизайн исследования и написание текста статьи — Алыменко М. А., Валиев Р. Ш., Валиев Н. Р., Полоников А. В., Попова Е. В.; сбор и обработка материала — Алыменко М. А., Трагира И. Н., Сусликова Е. И.; статистическая обработка данных — Алыменко М. А., Волкова С. Н., Козлов В. В.; редактирование и формирование заключительного варианта публикации — Валиев Р. Ш., Маль Г. С.; ответственность за целостность всех частей статьи — Валиев Р. Ш.

- 2017; 95 (5): 7–16. [Vasilyeva I.A., Belilovsky E.M., Borisov S.E. etc. Global reports of the World Health Organization on Tuberculosis. Formation and interpretation. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2017; 95 (5): 7–16. (in Russian)]
3. Иванова Д.А., Борисов Е.Е. Спектр и факторы риска нежелательных побочных реакций при лечении больных туберкулёзом лёгких. Туберкулёз и болезни лёгких. 2017; 95 (6): 22–29. [Ivanova D.A., Borisov E.E. Spectrum and risk factors of undesirable adverse reactions in the treatment of patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2017; 95 (6): 22–29. (in Russian)]
4. Казаков А.В., Можокина Г.Н., Аксенова В.А. Влияние генетического полиморфизма генов ферментов, ответственных за биотрансформацию противотуберкулёзных препаратов на риск развития гепатотоксических реакций у больных туберкулёзом. Антибиотики и химиотер. 2018; 63 (5–6): 20–25. [Kazakov A.V., Mozhokina G.N., Aksanova V.A. Effect of genetic polymorphism of the enzyme genes responsible for biotransformation of antituberculous drug on the risk of hepatotoxic reaction in patients with tuberculosis. *Antibiotiki i Khimioter* = Antibiotics and Chemotherapy. 2018; 63 (5–6): 20–25. (in Russian)]
5. Галкина К.Ю. Определение типа ацетилирования у больных туберкулёзом лёгких. Научные труды: к 80-летию со дня рождения академика РАМН В.И. Литвинова. М.: 2021; 543–553. [Galkina K.Yu. Determination of the type of acetylation in patients with pulmonary tuberculosis. Scientific works: to the 80th anniversary of the birth of Academician V.I. Litvinov of the Russian Academy of Medical Sciences. Moscow: 2021; 543–553. (in Russian)]
6. Соколова Г.Б. Индивидуализированная химиотерапия туберкулёза лёгких (экспериментально-клиническое исследование): Дис. ... д-ра мед. наук, в виде научного доклада. М.: 2000. [Sokolova G.B. Individualized chemotherapy of pulmonary tuberculosis (experimental clinical study): Dis. ... Doctor of Medical Sciences, in the form of a scientific report. — M.: 2000. (in Russian)]
7. Wang D., Johnson A.D., Papp A.C., Kroetz D.L., Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR 1, ABCB 1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15(10): 693–704.
8. Mootj M.G., Nies A.T., Knibbe C.A., Schaeffeler E., Tibboel D., Schwab M. et al. Development of human membrane transporters: drug disposition and pharmacogenetics. *Clin Pharmacokinet*. 2016; 55 (5): 507–24. doi: 10.1007/s40262-015-0328-5.
9. Cai Y., Yi J., Zhou C., Shen X. Pharmacogenetic study of drug-metabolising enzyme polymorphisms on the risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e47769. doi: 10.1371/journal.pone.0047769.
10. Canaparo R., Finnstrom N., Serpe L. et al. Expression of CYP3A isoforms and P-glycoprotein in human stomach, jejunum and ileum. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Nov; 34 (11): 1138–1144. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04691.x.
11. Belmonte C., Ochoa D., Roman M., Saiz-Rodriguez M., Wojnicz A., Gomez-Sanchez C.I. et al. Influence of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms on pharmacokinetics and safety of aripiprazole in healthy volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018; 122 (6): 596–605. doi: 10.1111/bcpt.12960. Epub 2018 Feb 22.
12. Полонников А.В. Полиморфизм генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков и их комплексное влияние на предрасположенность к мультифакториальным заболеваниям: дис... доктора медицинских наук: 03.00.15. М.: 2006; 442. [Polonnikov A.V. Polymorphism of genes of xenobiotic biotransformation enzymes and their complex effect on predisposition to multifactorial diseases: diss...Doctors of Medical Sciences: 03.00.15. Moscow: 2006' 442. (in Russian)]
13. Павлова Е.Н., Ерохина М.В., Рыбалькина Е.Ю. и др. Влияние рифампицина на индукцию активности MDR1/P-gp в провоспалительных макрофагах человека. Антибиотики и химиотер. 2022; 67 (3–4): 16–22. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-3-4-16-22>. [Pavlova E.N., Erokhina M.V., Rybalkina E.Yu., etc. The effect of rifampicin on the induction of MDR1/P-gp activity in human proinflammatory macrophages. *Antibiotiki i Khimioter* = Antibiotics and Chemotherapy. 2022; 67 (3–4): 16–22. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-3-4-16-22>. (in Russian)]

Информация об авторах

Альменко Максим Алексеевич — к. м. н., ассистент кафедры фтизиатрии и пульмонологии КГМА — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия; аналитик ФИАЦ ММБР ФГБУ «ЦСП» ФМБА России отдела прогнозирования и оценки биологических рисков; доцент кафедры общей биологии и фармации, Медицинский факультет НОУ ВО «Московский финансово-промышленный университет «Синергия», Москва, Россия. SPIN-код автора: 7833-4640. ORCID ID: 0000-0001-7341-3648. Scopus Author ID: 57189520353. ResearcherID: HGC-7298-2022

Валиев Равиль Шамилович — д. м. н., профессор, главный фтизиатр Приволжского федерального округа, Заслуженный врач России и Республики Татарстан, заведующий кафедрой фтизиатрии и пульмонологии Казанской государственной медицинской академии — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия. SPIN-код: 4028-4329. AuthorID: 784016. Scopus Author ID: 7103235075. ORCID ID 0000-0001-8353-8655

Валиев Наиль Равилевич — к. м. н., доцент кафедры фтизиатрии и пульмонологии КГМА — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия. SPIN-код: 4696-2770. AuthorID: 784210. Scopus Author ID 22939704300. ORCID ID: 0000-0002-6702-6243

About the authors

Maxim A. Alymenko — Ph. D. in Medicine, Assistant of the Department of Phthisiology and Pulmonology of Kazan State Medical Academy — Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kazan, Russia; Analyst at the Department of Forecasting and Assessment of Biological Risks, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency; Associate Professor of the Department of General Biology and Pharmacy, Faculty of Medicine, Moscow Financial and Industrial University «Synergy», Moscow, Russia. Author SPIN: 7833-4640. ORCID ID: 0000-0001-7341-3648. Scopus Author ID: 57189520353. ResearcherID: HGC-7298-2022

Ravil Sh. Valiev — D. Sc. in Medicine, Professor, Chief Phthisiologist of the Volga Federal District, Honored Doctor of Russia and the Republic of Tatarstan, Head of the Department of Phthisiology and Pulmonology of the Kazan State Medical Academy — Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kazan, Russia. SPIN code: 4028-4329. AuthorID: 784016. Scopus Author ID: 7103235075. ORCID ID: 0000-0001-8353-8655

Nail R. Valiev — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Phthisiology and Pulmonology of the Kazan State Medical Academy — Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kazan, Russia. SPIN code: 4696-2770. AuthorID: 784210. Scopus Author ID: 22939704300. ORCID ID: 0000-0002-6702-6243

Трагира Ирина Николаевна — главный инфекционист ЦФО, руководитель Центра общей инфектологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных болезней» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-6370-779X

Полоников Алексей Валерьевич — д. м. н., профессор, директор Научно-исследовательского института генетической и молекулярной эпидемиологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, Россия. WoS Researcher ID: R-7537-2016. Scopus Author ID: 6506508435. ORCID ID: 0000-0001-6280-247X. eLIBRARY SPIN-код: 6373-6556

Балобанова Наталья Петровна — к. б. н., заведующая кафедрой общей биологии и фармации, Медицинский факультет НОУ ВО «Московский финансово-промышленный университет «Синергия», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-1946-1379. SPIN-код: 2322-3924. Author ID: 57216767411. Scopus ID: 57208336716

Батищев Александр Витальевич — к. э. н., доцент, заведующий кафедрой искусственный интеллект и анализ данных, НОУ ВО «Московский финансово-промышленный университет «Синергия», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-4872-0608. Researcher ID: ADD-4751-2022. eLibrary AuthorID: 531377. SPIN-код: 7959-6220

Коломиц Владислав Михайлович — д. м. н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук. ORCID ID: 0009-0002-2042-4460. Scopus Author ID: 594235

Маль Галина Сергеевна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой общей фармакологией ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, Россия. WoS Researcher ID: B-3601-2013. Scopus Author ID: 6506311464. ORCID ID: 0000-0003-2723-781X. eLIBRARY SPIN-код: 4371-7708

Волкова Светлана Николаевна — д. ф.-т. н., профессор, заведующая кафедрой физико-математических дисциплин и информатики ФГБОУ ВО Курская ГСХА им. Иванова, Курск, Россия. eLIBRARY SPIN-код: 9040-6694. ORCID ID: 0000-0002-7247-2432

Козлов Василий Владимирович — к. м. н., доцент кафедры общественного здоровья и здравоохранения им. Н. А. Семашко, Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва, Россия. SPIN-code: 7703-0013. ORCID ШВ: 0000-0002-2389-3820. Researcher ID: B-2647-2017. Scopus Author ID: 57191536076

Суслкова Елена Ивановна — заведующая 1 терапевтическим отделением ОБУЗ «Областной клинический противотуберкулезный диспансер», Курская обл., д. Щетинка, Россия. ORCID: 0009-0006-6791-3551. Researcher ID: IAL-9418-2023

Попова Елизавета Владимировна — врач-педиатр БУЗ ВО Областная детская клиническая больница № 2, Воронеж, Россия. ORCID ID: 0009-0002-3342-7329

Irina N. Tragira — Chief infectious disease specialist of the Central Federal District, Head of the Center for General Infectology of the National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6370-779X.

Alexey V. Polonikov — D. Sc. in Medicine, Professor, Director of the Research Institute of Genetic and Molecular Epidemiology of the Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia. WoS Researcher ID: R-7537-2016. Scopus Author ID: 6506508435. ORCID ID: 0000-0001-6280-247X. eLIBRARY SPIN code: 6373-6556

Natalya P Balobanova — Ph. D. in Biology, Associate Professor, Head of the Department of General Biology and Pharmacy, Faculty of Medicine, Moscow Financial and Industrial University «Synergy», Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-1946-1379. SPIN-код: 2322-3924. Author ID: 57216767411. Scopus ID: 57208336716

Alexander V. Batishchev — Ph. D. in Economics, Associate Professor, Head of the Department of Artificial Intelligence and Data Analysis, Moscow Financial and Industrial University «Synergy», Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-4872-0608. Researcher ID: ADD-4751-2022. eLibrary AuthorID: 531377. SPIN-код: 7959-6220

Vladislav M. Kolomiets — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Phthisiopulmonology, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia. ORCID ID: 0009-0002-2042-4460. Scopus Author ID: 594235

Galina S. Mal — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of General Pharmacology, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia. WoS Researcher ID: B-3601-2013. Scopus Author ID: 6506311464. ORCID ID: 0000-0003-2723-781X. eLIBRARY SPIN code: 4371-7708

Svetlana N. Volkova — D. Sc. in Physical and Technical Sciences, Professor, Head of the Department of Physical and Mathematical Disciplines and Computer Science, Kursk State Agricultural Academy named after Ivanova, Kursk, Russia. eLIBRARY SPIN: 9040-6694. 7. ORCID: 0000-0002-7247-2432

Vasily V. Kozlov — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Public Health and Healthcare named after N. A. Semashko, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia. SPIN code: 7703-0013. ORCID: 0000-0002-2389-3820. Researcher ID: B-2647-2017. Scopus Author ID: 57191536076

Elena I. Suslikova — Head of the 1st Therapeutic Department of the Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, Kursk region, Shchetinka village, Russia. ORCID ID: 0009-0006-6791-3551. Researcher ID: IAL-9418-2023

Elizaveta V. Popova — pediatrician, Regional Children's Clinical Hospital No. 2, Voronezh, Russia. ORCID ID: 0009-0002-3342-7329

Оценка эффективности новых неспецифических средств медицинской защиты в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок

Т. Е. СИЗИКОВА, В. Н. ЛЕБЕДЕВ, *С. В. БОРИСЕВИЧ

¹ ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Минобороны России, Сергиев Посад, Россия

The Estimation of Efficacy of Nonspecific Medications Against Hemorrhagic Fevers Caused by Arenaviruses

TATIANA E. SIZIKOVA, VITALIY N. LEBEDEV, *SERGEY V. BORISEVICH

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

Резюме

Представлен анализ исследований по оценке эффективности новых неспецифических средств медицинской защиты (СМЗ) в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок. Рассмотрены возможные мишени для неспецифических СМЗ, классы изученных противовирусных препаратов, методы доклинического изучения противовирусных препаратов *in vitro* и на лабораторных животных, а также перспективы их использования в практике здравоохранения в настоящее время. Показано, что уровень разработки неспецифических СМЗ в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок существенно уступает таковому для филовирусных инфекций. В качестве наиболее эффективного неспецифического СМЗ в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок в настоящее время следует рассматривать фавипиравир.

Ключевые слова: аренавирусные геморрагические лихорадки; вирус Хунин; вирус Ласса; медицинские средства защиты; фавипиравир

Для цитирования: Сизикова Т. Е., Лебедев В. Н., Борисевич С. В. Оценка эффективности новых неспецифических средств медицинской защиты в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68: 7–8: 70–77. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-70-77>.

Abstract

The article presents an analysis of studies assessing the effectiveness of new nonspecific medications against hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. The possible targets for nonspecific medications, classes of researched antiviral preparations, methods of preclinical investigation of antiviral preparations *in vitro* and on laboratory animals, as well as prospects for their use in healthcare at present are considered. It has been shown that the level of development of nonspecific medications against hemorrhagic fevers caused by arenaviruses is significantly inferior to those against filovirus infections. Favipiravir should currently be considered as the most effective nonspecific medication against hemorrhagic fevers caused by arenaviruses.

Key words: hemorrhagic fevers caused by arenaviruses; Junin virus; Lassa virus; therapeutic; favipiravir

For citation: Sizikova T. E., Lebedev V. N., Borisevich S. V. The estimation of efficacy of nonspecific medications against hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. *Antibiotiki i Khimioter.* = *Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68: 7–8: 70–77. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-70-77>.

Введение

Род *Arenavirus* семейства Arenaviridae включает 26 отдельных вирусов, которые разделяются на две группы — аренавирусы Старого Света (прототипные представители: вирусы лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) и Ласса) и аренавирусы Нового Света, разделённые на 4 клада (A–D). Патогенные для человека аренавирусы Нового Света

(вирусы Мачупо, Хунин, Гуанарито, Сэбиа, Чапаре) входят в клад B [1, 2].

Естественными хозяевами большинства аренавирусов являются мышевидные грызуны, и географическое распределение каждого аренавируса определяется областью обитания соответствующего хозяина.

Исследования показали, что для каждого аренавируса есть только один основной резер-

вуар. Для вируса Мачупо таким резервуаром является большая вечерняя мышь (*Calomys callosus*), для вируса Хунин — хомячковые грызуны *Calomys musculinus*, для вируса Гуанарито — короткохвостый камышовый хомяк (*Zygodontomys brevicauda*). Люди заражаются в результате контакта с инфицированными грызунами или вдыхания пыли, контактированной экскрементами грызунов [3].

Этиологическими агентами вирусных геморрагических лихорадок (ГЛ) человека являются семь аренавирусов: вирусы Ласса, Луйо, Чапаре (возбудители одноимённых геморрагических лихорадок), вирусы Мачупо, Хунин, Гуанарито, Сэбия (возбудители Боливийской (БГЛ), Аргентинской (АГЛ), Венесуэльской (ВГЛ) и Бразильской (БрГЛ) геморрагических лихорадок, соответственно) [2–9].

Вирус Ласса в Западной Африке ежегодно вызывает до 300 тыс. случаев, 5–10 тыс. из которых заканчиваются летальным исходом [10].

Из аренавирусов Нового Света наибольший уровень заболеваемости вызывает вирус Хунин. Ежегодно регистрируют вспышки АГЛ в постоянно расширяющемся регионе, расположенному в северной части центра Аргентины. Группа риска включает почти 5 млн человек [11].

Новые патогенные для человека аренавирусы могут появляться через каждые несколько лет. Аренавирусы Чапаре и Луйо были выделены в ходе недиагностируемых случаев геморрагических лихорадок в Боливии [4] и Замбии [5]. Уровень летальности среди заболевших достигает 80% (для геморрагической лихорадки Луйо и БГЛ) [4, 11].

Несмотря на опасность, которую аренавирусные геморрагические лихорадки представляют для здравоохранения, лицензированные средства медицинской защиты в настоящее время отсутствуют. Единственной вакциной против аренавирусных инфекций является штамм *Candid 1* вируса Хунин, используемый для иммунизации против АГЛ [12].

Противовирусная терапия ограничена использованием неиммунносупрессивного аналога гуанозина — рибавирина (1- β -D-рибофуранозил-1-N-1,2,4-тризол-3 карбоксамид), являющегося ингибитором инозинмонофосфатдегидрогеназы, который эффективен в отношении ряда аренавирусов [6, 13–15].

Существенным недостатком данного препарата является его токсичность для человека. Приём рибавирина приводит к тромбоцитозу, анемии и осложнениям беременности [11].

В настоящее время определены молекулярные механизмы, определяющие вирулентность аренавирусов и патогенез вызываемых ими геморрагических лихорадок. Важнейшим патогенетическим фактором является способность свя-

зываания гликопротеина патогенных для человека аренавирусов с различными клеточными рецепторами.

Первичным рецептором для вируса Ласса является α -дистротригликан (экспрессируемый клеточный гликопротеин, связывающий клетки в экстрацеллюлярный клеточный матрикс) [16].

Степень связывания гликопротеина с α -дистротригликаном определяет различия между аттенуированными и вирулентными штаммами одного и того же вируса. Эти различия могут определяться единичными аминокислотными заменами [17].

Патогенные для человека аренавирусы Нового Света (Мачупо, Хунин, Сэбия, Гуанарито и Чапаре) в качестве рецептора для входа в клетки используют трансферриновый рецептор 1 (TfR1). Сама способность связывания с данным рецептором определяет патогенность (или отсутствие таковой) конкретного аренавируса для человека [18, 19].

В настоящее время идентифицирован участок связывания GP-1 вируса Мачупо с рецептором TfR1. Это остаток тирозина в положении 211 GP1. Этот участок является определяющим при создании комплекса GP1-TfR1, т. е. является критическим для возможности входа вируса в клетку. Рецептор TfR1 играет существенную роль в процессе поглощения железа. Он связывает содержащий железо трансферрин и транспортирует его в отдел клетки с кислым значением pH, где железо освобождается и в дальнейшем транспортируется через везикулярную мембрану в цитоплазму клетки [20]. Поскольку обеспечение данного процесса является важнейшей функцией TfR1, связывание этого участка патогенными аренавирусами может привести к существенному повышению цитоксичности. Однако патогенные для человека аренавирусы Нового Света связывают регион, расположенный в верхушечной области TfR1, который не перекрывает с участком связывания данного рецептора. Более того, любой риск цитоксичности, связанной с взаимодействием GP1 и TfR1, уменьшается в связи с короткой продолжительностью возможности эффективной профилактики, требуемой при острых ВГЛ. Эти данные определяют дизайн малых молекул, используемых в качестве противовирусных препаратов направленных на предотвращение входа вируса в клетку [11].

Одним из наиболее очевидных препаратов, ингибирующих процесс связывания и входа аренавирусов в клетку, являются гуманизированные антитела против TfR1, которые ингибируют процесс связывания TfR1 с GP1 аренавирусов. Поскольку эти антитела не нацелены на участки TfR1, не связанные с транспортом трансферрина, они не влияют на его функциональные свойства. Введение таких антител полностью не предотвра-

щает развитие инфекции. Однако оно способно ограничить репликацию и распространение вируса у инфицированных больных и, следовательно, замедлить развитие заболевания, что позволит выработать вируснейтрализующие антитела (ВНА), необходимые для излечения [1]. Уменьшенные растворимые формы TfR1 (например, его верхушечного участка) могут действовать в сходном плане. Экспрессия TfR1 регулируется посредством восприимчивых к железу элементов на 3'-нетранслируемом участке его транспортной РНК. Когда концентрация железа внутри клетки является пониженной, увеличивается выработка поверхностью клетки TfR1.

Высокий уровень поверхностного TfR1 может обеспечить более высокий уровень репликации патогенных аренавирусов. Следовательно, дополнительное введение обычно используемых при лечении анемии препаратов, содержащих ионы железа, может уменьшить репликацию аренавирусов за счёт снижения уровня экспрессии TfR1. При этом обязательным является жёсткий контроль содержания железа в двенадцатиперстной кишке.

Скрининг малых молекул и препаратов, основанный на постановке ИФА при использовании в качестве специфических компонентов реакции растворимого TfR1 и очищенного GP1 аренавирусов является эффективным инструментом отбора кандидатов в противовирусные препараты в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок. Затем эти препараты должны быть испытаны *in vivo* (на моделях грызунов, а затем макак резус), а в дальнейшем пройти клинические испытания [11].

Группа препаратов, направленная на задержку или предотвращение транскрипции и репликации вирусной РНК может действовать при использовании нескольких механизмов. Во-первых, малые молекулы, имеющие в качестве мишени вирусные РНК, могут изменять их структуру и, следовательно, интерферировать с взаимодействием РНК и белков и образованием комплекса РНК-белок. Этот тип препаратов способен, например, блокировать взаимодействие между L-белком вируса Мачупо и его участком связывания в позициях 2–5 консервативного вирусного промотора [8]. Во-вторых, препараты, имеющие в качестве мишени белок L, изменяют его функциональные свойства в процессе вирусной транскрипции и репликации. Установлена корреляция между эндонуклеазной активностью и селективной продукцией транспортных РНК. Эндонуклеазная активность определяет механизм кэпирования, используемый аренавирусами. Выявлен активный участок белка L вируса LHM, включающий 6 аминокислотных остатков (глутаминовая кислота в позициях 51 и 102, аспарагиновая кислота в пози-

циях 89 и 119, лизин в позициях 115 и 122). Аминокислотные остатки (аспарагиновой кислоты в позиции 89, глутаминовой кислоты в позиции 102 и пролина в позиции 88) являются консервативными для всех аренавирусов [21].

При транскрипции и репликации аренавирусов важную роль играет взаимодействие между N и C концевыми участками белка нуклеопротеина и образование димеров данного белка. Участки, обеспечивающие связывание с геномной РНК, представляют потенциальные мишени для противовирусных препаратов [22, 23].

Мишенью для препаратов, ингибирующих репликацию вируса Ласса, являются область между консервативными аминокислотными остатками тирозина в позиции 308, аргинина в позиции 300 и нуклеотидный остаток аденина в позиции 3 РНК. Мутации в указанных аминокислотных остатках белка нуклеопротеина могут изменить характерную для аренавирусов функцию подавления синтеза интерферона [11].

Рассмотрим классы противовирусных препаратов в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок. При анализе малых молекул был проведён скрининг из 400 000 различных молекул [19]. Механизм действия препаратов этого класса состоит в ингибировании процесса слияния вирусного гликопротеина с клеточной мембраной. Всего идентифицировано 6 химических различных классов малых молекул.

К первому классу препаратов относится препарат ST-294, который *in vitro* в наномолярных концентрациях ингибирует как вирус Такарибе, так и патогенные для человека аренавирусы Мачупо, Хунин и Гуанарито.

Изучение фармакодинамических свойств препарата ST-294 показали его метаболическую стабильность и биодоступность при пероральном введении в организм. При изучении противовирусной активности препарата ST-294 *in vivo* при экспериментальной инфекции мышей-сосунков вирусом Такарибе установлено, что данный препарат обладает протективными свойствами [11]. Мишенью для ST-294 является гликопротеин GP2. ST-294 ингибирует вход аренавирусов в клетки [24].

Следующий класс препаратов представляют вещества, механизмы противовирусной активности которых состоят в изменении структуры поверхностных белков аренавирусов.

К данной группе препаратов относятся дериват бензимидазола ST-37 и его оптимизированный аналог ST-193.

Концентрация этого препарата, обеспечивающая 50% вируснегативный эффект *in vitro*, для вирусов Мачупо, Хунин, Гуанарито и Ласса находится в диапазоне 0,2–12 нМ [25].

Для идентификации ингибиторов, которые в качестве мишени используют гликопротеин аре-

навирусов, А. М. Lee и соавт. [26] проанализировали свыше 80 000 малых молекул. В результате были идентифицированы два препарата 16G8 и 17G8, обладающие высокой специфической активностью как в отношении вирусов Мачупо, Хунин, Гуанарито и других аренавирусов Нового Света, так и в отношении вируса Ласса. Эти препараты влияют на процесс взаимодействия гликопротеина аренавирусов с мембраной инфицированных клеток, концентрация препарата, вызывающая 50% эффект, находится в диапазоне 200–350 нМ. Несмотря на различную структуру, все эти ингибиторы обладают сходным механизмом действия, направленным на pH-зависимое взаимодействие сигнального пептида и субъединицы GP2 в комплексе шипика гликопротеина. Ингибиторы 16G8 и 17G8 затрудняют вход вируса в клетки путём стабилизации структуры шипика перед слиянием, предотвращая тем самым pH-индуцированную активацию в эндосомах [25].

Для других типов ингибиторов мишенью является синтез вирусной РНК. Препаратор фавипиравир (6-флюоро-3гидрокси-2пиразинкарбоксамид) (препарат T-705) обладает широким спектром противовирусной эффективности в отношении различных таксономических групп РНК-содержащих вирусов. Препаратор T-705 действует как аналог пуриновых нуклеозидов, воздействуя на ген белка L. Установлено, что данный препарат обладает противовирусной активностью *in vitro* в отношении вирусов Мачупо, Хунин, Гуанарито [11]. Исследования показали, что препарат T-705 защищает хомячков, инфицированных вирусом Пичинде, причём препарат эффективен на поздних стадиях инфекции [27].

Другой препарат, акридон, (10-аллил-6-хлоро-4-метокси-9(10Н) (препарат 3f), ингибирал *in vitro* репродукцию вируса Хунин. Механизм ингибирования включает снижение количества клеточного гуанозинтрифосфата [28].

Проведены исследования группы препаратов, мишенью которых является ген белка Z. Эта группа включает азотные соединения, дериваты гидразина, реагенты, содержащие дисульфидную связь. Наиболее активный ингибитор из данной группы, препарат NSC20625, показал противовирусную эффективность в отношении вируса Хунин. Ароматический дисульфид NSC20625 является вирулицидным агентом, инактивирующим вирус посредством формирования вирионов, которые способны проникать в клетку, но не в состоянии воспроизвести полный цикл репродукции [29, 30].

У инактивированных вирионов вирусов Хунин и ЛХМ сохраняются биологические функции гликопротеина (адсорбция на клетку и пénétration через клеточную мембрану, но блокирован процесс депротеинизации вирусного нуклеокапсида) [31].

Обработка очищенного вируса Хунин препаратом NSC20625 снижает инфекционность посредством необратимой модификации матричного белка Z, что обнаруживается изменением его электрофоретического профиля и места субклеточной локализации.

При исследованиях, проводимых с вирусом ЛХМ, показано, что при воздействии препарата NSC20625 происходит олигомеризация белка Z аренавирусов в агрегаты с большой молекулярной массой. При этом препарат не действует на клеточные белки. Механизм противовирусного действия препарата NSC20625 включает подавление взаимодействия белка Z аренавирусов с клеточным промиелоцитическим лейкемическим белком [32].

Следующие препараты против вируса Хунин и других непатогенных аренавирусов относятся к классам ароматических и алифатических дисульфидов, тиурамдисульфидов и тиосульфонов. Данные препараты действуют на стадии, следующей за входом вируса в клетку, вероятно, за счёт взаимодействия с цинк-связывающим участком белка Z аренавирусов [11].

Для двух препаратов данного класса, ароматического деривата карбаксамида (препарат NSC4492) и аминодеривата (препарат NSC71033) установлена противовирусная активность *in vitro* в отношении вируса Хунин в субмикромолярных концентрациях. Дисульфид тиурама (препарат NSC145605) имел соответствующий противовирусный эффект только в микромолярных концентрациях.

С. С. García и соавт. [33] проведена оценка противовирусной активности *in vitro* в отношении вируса Хунин пяти азо-содержащих веществ. Наиболее эффективным препаратом признан 2-азо-(1'-(2'-нитрозо) нафто-бензоат (ANNB), эффективная концентрация которого, вызывающая 50% вирусингибирующий эффект, находилась в микромолярном диапазоне, при этом препарат не обладал непосредственным вирилицидным действием. Наиболее вероятно, что препарат ANNB ингибирует процесс сборки внутриклеточного вируса. В противоположность этому, азодикарбонамид способен к непосредственной инактивации вируса Хунин.

Также установлена антивирусная активность в отношении вируса Хунин антибактериальных катионных пептидов, таких как цекропин А и мелитин. Цекропин А действует на уровне вирусного морфогенеза и выходит из инфицированных клеток [34].

Азотсодержащие гетероциклические соединения, полученные из углеводов, также ингибируют репродукцию вируса Хунин [35].

Антисмыловые РНК

Это направление исследований по отношению к патогенным для человека аренавирусам

Таблица 1. Противовирусная активность неспецифических CM3 в отношении аренавирусов при испытаниях *in vitro*

Препарат	Возможный механизм противовирусного действия	Вирус	Метод оценки	Количественная характеристика противовирусного действия		Источник
				Тест ингибиования репродукции вируса	$I_{inh} = 1413$	
Рибовирин	Интерференция с белком L аренавирусов	Мачупо	Тест ингибиования репродукции вируса	$I_{inh} = 2512$	6, 14	25, 29
		Хунин	То же	$I_{inh} = 708$	13	
		Сэбия		$I_{inh} = 3162$	15	
		Ласса		$I_{inh} = 562$	11	
ST-294	Ингибиование процесса слияния вирусного гликопротеина с клеточной мембраной. Мишенью является гликопротеин GP2	Мачупо	Тест ингибиования бляшкообразования вируса	$I_{inh} = 708$		
		Хунин	То же	$I_{inh} = 501$		
		Гуанарито		$I_{inh} = 501$		
Дериват бензимидазола, ST-37	Изменение структуры поверхностных белков аренавирусов	JXM	Тест ингибиования репродукции вируса	$C_{50} 20-40 \text{ нМ}$	25	
Оптимизированный аналог деривата бензимидазола, ST-193	То же	Мачупо	То же	$C_{50} 0,2-12 \text{ нМ}$		
		Хунин				
		Гуанарито				
		Ласса				
16G8	Процесс взаимодействия гликопротеина аренавирусов с мембранный инфицированных клеток. pH-зависимое взаимодействие сигнального пептида и субъединицы GP2 в комплексе шипика гликопротеина. Вход вируса в клетки ингибируется путём стабилизации структуры шипика перед слиянием, тем самым предотвращается pH-индуцированная активация в эндосомах	Мачупо	Тест ингибиования репродукции вируса	$C_{50} 200-350 \text{ нМ}$	25, 26	
		Хунин	То же			
		Гуанарито				
		Ласса				
Фавипиравир (Т-705)	Препарат действует как аналог туриновых нуклеозидов, воздействуя на ген белка L. Установлена протективная эффективность препарата на поздних стадиях инфекции	Мачупо		$I_{inh} = 2818$	11, 27	
		Хунин		$I_{inh} = 4467$		
		Гуанарито		$I_{inh} = 1585$		
Акридон (3f)	Механизм ингибиования включает снижение количества клеточного гуанозинтрифосфата	Хунин		$C_{50} 500-750 \text{ нМ}$	28	
NSC20625	Формирование вирионов, сохраняющих биологические функции гликопротеина (адсорбция на клетку и пенетрация через клеточную мембрану), но у которых блокирован процесс депротеинизации вирусного нуклеокапсида	То же	Хунин, JXM — <i>in vitro</i>	$C_{50} 1,5-2,0 \text{ мМ}$	29-31	
NSC4492	Взаимодействие с цинк-связывающим участком белка Z аренавирусов	Хунин	Тест ингибиования репродукции вируса	$C_{50} 500-750 \text{ нМ}$	34	
NSC71033	То же	То же		$C_{50} 2,5-5,0 \text{ мМ}$		
NSC145605						

Таблица 1. Продолжение таблицы
Table 1. Table continued

Препарат	Возможный механизм противовирусного действия	Вирус	Метод оценки	Количественная характеристика противовирусного действия	Источник
ANNB	Ингибиование процесса сборки внутриклеточного вируса	То же	То же	C_{50} 700–900 нМ	33
Цекролин А	Ингибиование вирусного морфогенеза	То же	То же	C_{50} 2,5–5,0 мМ C_{50} 5,0–10,0 мМ	34 35

Примечание. I_{inh} — индекс ингибиорования, рассчитывали по формуле: $I_{inh} = 10 \log \frac{A_{ctrl}}{A_{test}}$ (1), где A_{ctrl} и A_{test} — концентрация биологически активного вируса, определённая в контроле и опыте (при использовании исследуемого препарата), соответственно; C_{50} — концентрация препарата, вызывающая 50% эффект, для расчёта показателя C_{50} используют математический аппарат, основанный на том, что изменение концентрации биологически активного вируса (в области его достоверного снижения) находится в линейной зависимости от логарифма концентрации обладающего противовирусной активностью препарата в ростовой среде.

Note. I_{inh} is the inhibition index, calculated using the formula: $I_{inh} = -10 \log \frac{A_{ctrl}}{A_{test}}$ (1), where A_{ctrl} and A_{test} are the concentration of biologically active virus, determined in the control and the experiment (using the test drug) groups, respectively; C_{50} is the concentration of the drug that causes a 50% effect; to calculate the C_{50} indicator, a mathematical apparatus is used, based on the fact that the change in the concentration of the biologically active virus (in the area of its significant decrease) is linearly dependent on the logarithm of the concentration of the drug with antiviral activity in the growth medium.

остаётся неразработанным, несмотря на создание библиотек антисмыловых РНК к другим вирусам, в том числе и к возбудителям особо опасных геморрагических лихорадок [36–38]. Однако следует ожидать проведения исследований в данном направлении.

Обобщённые данные о противовирусной активности изученных неспецифических СМЗ в отношении аренавирусов, представленные в табл. 1, 2, свидетельствуют о том, что изучение противовирусной активности подавляющей части представленных препаратов находится на первых стадиях доклинического изучения. Противовирусная активность большей части данных препаратов изучена главным образом в отношении вируса Хунин. Видимо, это можно объяснить тем, что АГЛ, наряду с геморрагической лихорадкой Ласса, представляет наибольший (по сравнению с другими аренавирусными геморрагическими лихорадками) уровень опасности для здравоохранения в эндемичных по заболеваниям регионах.

Рассмотренные в статье виды неспецифических СМЗ могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения как возможные препараты для профилактики и лечения заболеваний, вызванных патогенными для человека аренавирусами с учётом большей доступности и меньшей стоимости неспецифических СМЗ по сравнению со специфическими: это имеет существенное значение для предотвращения распространения заболевания при возникновении эпидемических вспышек, особенно в неэндемичных регионах.

Выводы

На основании изложенного, можно сделать следующие выводы.

1. Уровень разработки неспецифических СМЗ для профилактики и лечения заболеваний, вызванных патогенными для человека аренавирусами, существенно уступает таковому для филовирусных инфекций. Это может быть связано с тем, что в отличие от группы филовирусных геморрагических лихорадок, против одной из аренавирусных геморрагических лихорадок (АГЛ) уже достаточно давно получен эффективный вакцинальный штамм, в отношении большинства возбудителей аренавирусных геморрагических лихорадок описан (и использован на практике) профилактический эффект рибавирина.

2. В качестве наиболее эффективного неспецифического СМЗ в отношении аренавирусных геморрагических лихорадок, в настоящее время следует рассматривать фавипиравир, ввиду его установленной противовирусной эффективности по отношению к вирусам других таксономических групп. Наиболее целесообразным путём приме-

Таблица 2. Защитная эффективность неспецифических СМЗ в отношении аренавирусов при испытаниях *in vivo*

Table 2. Protective efficacy of nonspecific medications against arenaviruses when tested *in vivo*

Препарат	Вирус	Лабораторные животные	Метод оценки	Доля выживших животных, %	Источник
Рибавирин	Ласса	Яванские макаки	Внутримышечное инфицирование животных вирусом Ласса, штамм Джозиа, в дозе 1×10^3 БОЕ с последующим введением препарата по схеме экстренной профилактики	90	15
ST-294	Такарибе	Белые мыши-сосунки	Внутримозговое инфицирование животных вирусом Такарибе, штамм МВ, в дозе 1×10^2 БОЕ с последующим введением препарата по схеме экстренной профилактики	70	11
Фавипиравир (T-705)	Пичинде	Сирийские хомячки-сосунки	Подкожное инфицирование животных вирусом Пичинде, штамм SH2, в дозе 1×10^3 БОЕ с последующим введением препарата по схеме экстренной профилактики	100	
			Подкожное инфицирование животных вирусом Пичинде, штамм SH2, в дозе 1×10^3 БОЕ с последующим введением препарата по схеме экстренной профилактики	80	

нения данного препарата является профилактический приём незадолго и во время посещения

регионов, эндемичных по патогенным для человека аренавирусам.

Литература/References

- Peters C.J., Jahrling P.B., Liu C.T., Kenyon R.H., McKee K.T.Jr., Barrera Oro J.G. Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1987; 134: 5–68. doi: 10.1007/978-3-642-71726-0-2.
- Radoshitzky S.R., Bao Y., Buchmeier M.J., Charrel R.N., Clawson A., Clegg C., DeRisi J.L., Gonzales J.P., Kuhn J.H., Lukashevich I.S., Peters C.J., Romanowski V., Salvato M.S., Stanglein M.D., de la Torre J.C. Past, present and future of arenavirus taxonomy. *Arch Virol.* 2015; 160 (7): 1851–1874. doi: 10.1007/s00705-015-2418-y.
- Charrel R.N., de Lamballerie X. Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Res.* 2003; 57 (1–2): 89100. doi: 10.1016/s0166-3542(02)00202-4.
- Briese T., Pauwels J.T., McMullan L.K., Hutchison S.K., Street C., Palacios G., Khristova M.L., Weyen J., Swanepoel R., Egholm M., Nichol S.T., Lipkin W.I. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathog.* 2009; 5 (5): 1–8. doi: 10.1371/journal.ppat.1000455.
- Delgado S., Erickson B.R., Agudo R., Blair P.J., Vallejo E., Albariño C.G., Vargas J., Comer J.A., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Olson J.G., Nichol S.T. Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog.* 2008; 4 (4): 1–6. doi: 10.1371/journal.ppat.1000047.
- Emia D.A., Maiztegui J.I. Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 1994; 23(1): 23–31. doi: 10.1016/0166-3542(94)90030-2.
- Gonsales J.P., Bowen M.D., Nichol S.T., Rico-Hesse R. Genetic characterization and phylogeny of Sabia virus, an emergent pathogen in Brazil. *Virology.* 1996; 221 (2): 318–324. doi: 10.1006/viro.1996.0381.
- Kranzusch P.J., Schenk A.D., Rahmeh A.A., Radoshitzky S.R., Bavari S., Walz T., Whelan S.P. Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107 (46): 20069–74. doi: 10.1073/pnas.1007152107.
- Salas R., de Manzione N., Tesh R. et al. Venezuelan hemorrhagic fever. *Lancet.* 1991; 338: (8774): 1033–1036. doi: 10.1016/0140-6736(91)91899-6.
- McCormick J.B., Fisher-Hoch S.P. Lassa fever. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002; 262: 75–109. doi: 10.1007/978-3-642-56029-3_4.
- Radoshitzky S.R., Kuhn J.H., de Kok-Mercado F., Jahrling P.B., Bavari S. Drug discovery technologies and strategies for Machupo virus and other New World arenaviruses. *Expert Opin Drug Discov.* 2012; 7 (7): 613–32. doi: 10.1517/17460441.2012.687719.
- Emia D.A., Barrera O.J.G. Junin virus vaccines /In: Oldstone M.B.A. *Arenaviruses II The Molecular pathogenesis of arenavirus infections.* Springer Verlag, Berlin, 2002.
- Barry M., Russi M., Armstrong L., Geller D., Tesh R., Dembry L., Gonzalez J.P., Khan A.S., Peters C.J. Brief report: treatment of a laboratory-acquired Sabia virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333(5): 294–296. doi: 10.1056/NEJM19950803330505.
- Emia D.A., Briggiler A.M., Sánchez Z. Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2008; 78 (1): 132–9. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.10.010.
- Khan S.H., Goba A., Chu M., Roth C., Healing T., Marx A., Fair J., Guttieri M.C., Ferro P., Imes T., Monagin C., Garry R.F., Bausch D.G. New opportunities for field research on the pathogenesis and treatment of Lassa fever. *Antiviral Res.* 2008; 78 (1): 103–15. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.11.003.
- Cao W., Henry M.D., Borrow P., Yamada H., Elder J.H., Ravkov E.V., Nichol S.T., Compans R.W., Campbell K.P., Oldstone M.B. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytes choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science.* 1998; 282: 2079–2081.
- Shao J., Liang Y., Ly H. Human hemorrhagic fever causing arenaviruses: molecular mechanisms contributing to virus virulence and disease pathogenesis. *Pathogens.* 2015; 4 (2): 283–306. doi: 10.3390/pathogens4020283.
- Helguera G., Jemielity S., Abraham J., Cordero S.M., Martinez M.G., Rodríguez J.A., Bregni C., Wang J.J., Farzan M., Penichet M.L., Candurra N.A., Choe H. An antibody recognizing the apical domain of human transferrin receptor 1 efficiently inhibits the entry of all new world hemorrhagic fever arenaviruses. *J Virol.* 2012; 86 (7): 4024–4028. doi: 10.1128/JVI.06397-11.
- Radoshitzky S.R., Kuhn J.H., Spiropoulos C.E., Albarino G.G., Nguyen D.P., Salazar-Bravo J., Dortsman T., Lee A.S., Wang E., Ross S.R. Receptor determinants of zoonotic transmission of New World hemorrhagic fever arenaviruses. *PNAS USA.* 2008; 105: 2664–2669. doi: 10.1073/pnas.0709254105.
- Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Andrews N.C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2004; 117 (3): 285–297. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00343-5.
- Morin B., Coutard B., Lelke M., Ferron E., Kerber R., Jamal S., Frangeul A., Baronti C., Charrel R., de Lamballerie X., Vonrhein C., Lescar J., Bricogne G., Günther S., Canard B. The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (9): 1–11. doi: 10.1371/journal.ppat.1001038.

22. Brunotte L, Kerber R, Shang W, Hauer F, Hass M, Gabriel M, Lelke M, Busch C, Stark H, Svergun D.I., Betzel C, Perbandt M, Günther S. Structure of the Lassa virus nucleoprotein revealed by X-ray crystallography, small-angle X-ray scattering, and electron microscopy. *J Biol Chem.* 2011; 286 (44): 38748–56. doi: 10.1074/jbc.M111.278838.
23. Hastie K.M., Liu T, Li S, King L.B., Ngo N, Zandonatti M.A., Woods V.L.Jr., de la Torre J.C., Saphire E.O. Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108 (48): 19365–70. doi: 10.1073/pnas.1108515108.
24. Bolken T.C., Laquerre S, Zhang Y, Bailey T.R., Pevsar D.C., Kickner S.S., Sperzel L.E., Jones K.F., Warren T.K., Lund S.A., Kirkwood-Watts D.L., King D.S., Shurtliff A.C., Guttieri M.C., Deng Y, Bleam M., Hruby D.E. Identification and characterization of potent small molecule inhibitor of hemorrhagic fever New World arenaviruses. *Antiviral Res.* 2006; 69 (2): 86–97. doi:10.1016/j.antiviral. 2005.10.008.
25. Larson R.A., Dai D, Hosack V.T., Tan Y, Bolken T.C., Hruby D.E., Amberg S.M. Identification of a broad-spectrum arenavirus entry inhibitor. *J Virol.* 2008; 82 (21): 10768–75. doi: 10.1128/JVI.00941-08.
26. Lee A.M., Rojek J.M., Spiropoulou C.F., Gundersen A.T., Jin W, Shaginian A., York J., Nunberg J.H., Boger D.L., Oldstone M.B., Kunz S. Unique small molecule entry inhibitors of hemorrhagic fever arenaviruses. *J Biol Chem.* 2008; 283 (27): 18734–42. doi: 10.1074/jbc.M802089200.
27. Gowen B.B., Smee D.E., Wong M.H., Hall J.O., Jung K.H., Bailey K.W., Stevens J.R., Furuta Y, Morrey J.D. Treatment of late stage disease in a model of arenaviral hemorrhagic fever: T-705 efficacy and reduced toxicity suggests an alternative to ribavirin. *PLoS One.* 2008; 3 (11): 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0003725.
28. Sepúlveda C.S., García C.C., Fasico M.L., D'Accorso N.B., Docampo Palacios M.L., Pellón R.F., Damonte E.B. Inhibition of Junin virus RNA synthesis by an antiviral acridone derivative. *Antiviral Res.* 2012; 93 (1): 16–22. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.10.007.
29. García C.C., Candurra N.A., Damonte E.B. Antiviral and virucidal activities against arenaviruses of zinc-finger active compounds. *Antivir Chem Chemother.* 2000; 11 (3): 231–237. doi: 10.1177/095632020001100306.
30. García C.C., Candurra N.A., Damonte E.B. Mode of inactivation of arenaviruses by disulfide-based compounds. *Antiviral Res.* 2002; 55 (3): 437–446. doi: 10.1016/s0166-3542(02)00076-1.
31. García C.C., Ellenberg P.C., Artuso M.C., Scolaro L.A., Damonte E.B. Characterization of Junín virus particles inactivated by a zinc finger-reactive compound. *Virus Res.* 2009; 143 (1): 106–113. doi: 10.1016/j.virusres.2009.03.010.
32. García C.C., Topisirovic I., Djavani M., Borden K.L., Damonte E.B., Salvato M.S. An antiviral disulfide compound blocks interaction between arenavirus Z protein and cellular promyelocytic leukemia protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393 (4): 625–630. doi: 10.1016/j.bbrc. 2010.02.040.
33. García C.C., Candurra N.A., Damonte E.B. Differential inhibitory action of two azoic compounds against arenaviruses. *Int J Antimicrob Agents.* 2003; 21 (4): 319–324. doi: 10.1016/s0924-8579(02)00390-4.
34. Albiol Matanic V.C., Castilla V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 23 (4): 382–389. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2003.07.022.
35. Barradas J.S., Errea M.I., D'Accorso N.B., Sepúlveda C.S., Talarico L.B., Damonte E.B. Synthesis and antiviral activity of azoles obtained from carbohydrates. *Carbohydr Res.* 2008; 343 (14): 2468–2474. doi: 10.1016/j.carres.2008.06.028.
36. Dunning J., Sahr F., Rojek A., Gannon F., Carson G., Idriss B., Massaquoi T., Gandi R., Joseph S., Osman H.K., Brooks T.J., Simpson A.J., Goodfellow I., Thorne L., Arias A., Merson L., Castle L., Howell-Jones R., Pardinaz-Solis R., Hope-Gill B., Ferri M., Grove J., Kowalski M., Stepniewska K., Lang T., Whitehead J., Olliaro P., Samai M., Horby P.W. Experimental Treatment of Ebola Virus Disease with TKM-130803: A Single-Arm Phase 2 Clinical Trial. *PLoS Med.* 2016; 13 (4): 1–19. doi: 10.1371/journal. pmed.1001997.
37. Geisbert T.W., Lee A.C., Robbins M., Geisbert J.B., Honko A.N., Sood V., Johnson J.C., de Jong S., Tavakoli I., Judge A., Hensley L.E., MacLachlan I. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet.* 2010; 375 (9729): 1896–905. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60357-1.
38. Thi E.P., Mire C.E., Lee A.C.H., Geisbert J.B., Zhou J.Z., Agans K.N., Shead N.M., Deer D.J., Barbard T.R., Fenton K.A., MacLachlan I., Geisbert T.W. Lipid nanoparticle siRNA treatment of Ebola virus Makona infected primates. *Nature.* 2015; 521 (7552): 362–365. doi: 10.1038/nature14442.

Информация об авторах

Сизикова Татьяна Евгеньевна — к. б. н., старший научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1817-0126

Лебедев Виталий Николаевич — д. б. н., профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6552-4599

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, академик РАН, начальник института ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Московская область, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6742-3919. eLibrary Spin: 5753-3400

About the authors

Tatiana E. Sizikova — Ph. D. in Biology, 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1817-0126

Vitaliy N. Lebedev — D. Sc. in Biology, Professor, Leading Researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6552-4599

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

Изменение этиологической структуры и особенности выбора антибактериальной терапии при инфекционном эндокардите в педиатрической практике

*А. И. ДАНИЛОВ, А. В. ЕВСЕЕВ, Т. Г. АВДЕЕВА, Т. И. ЛЕГОНЬКОВА, Л. П. ЖАРКОВА

ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск, Россия

Changes in the Etiological Structure and Specifics When Choosing Antibacterial Therapy Against Infective Endocarditis in Pediatric Practice

*ANDREY I. DANILOV, ANDREY V. EVSEEV,

TATYANA G. AVDEEVA, TATYANA I. LEGONKOVA, LYUDMILA P. ZHARKOVA

Smolensk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Smolensk, Russia

Резюме

Инфекционный эндокардит у детей — редкое заболевание, но зачастую с крайне серьёзным прогнозом. Наиболее частым фактором риска инфекционного эндокардита у данной категории пациентов является наличие в анамнезе врожденного порока сердца. Вместе с тем, в последнее время среди предрасполагающих причин всё чаще отмечаются нарушение целостности периферического сосудистого русла за счёт проведения инвазивных диагностических и терапевтических медицинских процедур, а также тяжело протекающие соматические заболевания. В соответствии с разработанными рекомендациями, назначение антибактериальной терапии при инфекционном эндокардите должно основываться на этиотропной направленности. Учитывая указанные обстоятельства, в статье представлен обзор данных, отражающий вопросы этиологии и выбора антибактериальной терапии при инфекционном эндокардите в педиатрической практике.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит; педиатрическая практика; факторы риска; этиология; антибактериальная терапия

Для цитирования: Данилов А. И., Евсеев А. В., Авдеева Т. Г., Легонькова Т. И., Жаркова Л. П. Изменение этиологической структуры и особенности выбора антибактериальной терапии при инфекционном эндокардите в педиатрической практике. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68: 7–8: 78–82. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-78-82>.

Abstract

Infective endocarditis in children is a rare disease, which often has an extremely serious prognosis. The most common risk factor for infective endocarditis in this category of patients is the history of congenital heart disease. At the same time, currently, the disruption of the integrity of the peripheral vascular bed is increasingly noted, among the predisposing causes, due to invasive diagnostic and therapeutic medical procedures, as well as severe somatic diseases. In accordance with the developed recommendations, the appointment of antibacterial therapy for infective endocarditis should be based on etiologic orientation. Taking these circumstances into account, the article presents an overview of the data reflecting the issues of etiology and choice of antibacterial therapy for infective endocarditis in pediatric practice.

Keywords: *infective endocarditis; pediatric practice; risk factors; etiology; antibacterial therapy*

For citation: Danilov A. I., Evseev A. V., Avdeeva T. G., Legonkova T. I., Zharkova L. P. Changes in the etiological structure and specifics when choosing antibacterial therapy against infective endocarditis in pediatric practice. *Antibiotiki i Khimioter.* = *Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68: 7–8: 78–82. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-78-82>.

Актуальность

В настоящее время, заболеваемость инфекционным эндокардитом (ИЭ) в педиатрической практике составляет 0,43–0,69 случаев на 100 тыс. че-

ловек в год [1, 2]. При этом следует отметить, что данные низкие цифры заболеваемости создают значительные сложности в получении доказательств относительно наилучшего диагностического и терапевтического подхода ведения пациентов с ИЭ.

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Крупской, 28, Смоленский ГМУБ г. Смоленск, Россия, 214019.
E-mail: dr.danandr@yandex.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 28 Krupskoy st., Smolensk State Medical University, Smolensk, 214019 Russia.
E-mail: dr.danandr@yandex.ru

Внутригоспитальная летальность у пациентов с ИЭ в детской популяции достигает 5%, что несколько ниже, чем у взрослых. При этом следует отметить, что повторный эпизод ИЭ, а также наличие тяжёлой сопутствующей патологии в виде пороков сердца, поражения печени и почек могут значительно увеличить риски развития тяжёлого течения [3, 4].

Изменившаяся структура факторов риска (ФР) привела к тому, что ведущим возбудителем ИЭ как в детской, так и во взрослой популяции на сегодняшний день является *Staphylococcus aureus*, обуславливающий высокую частоту нарушений реологических свойств крови [5–7].

Крайне настораживающим обстоятельством является неуклонный рост резистентности большинства возбудителей к антибактериальным препаратам, применяемым в клинической практике [8], что уменьшает и так ограниченный перечень разрешённых к применению в педиатрической практике препаратов.

Учитывая вышеизложенное, была поставлена цель — систематизировать данные, размещённые в открытых зарубежных и отечественных источниках, касающиеся вопросов этиологии и особенностей выбора антибактериальной терапии ИЭ в педиатрической практике.

Структура факторов риска

Учитывая значительное количество случаев культурально-негативного ИЭ, определение потенциальных ФР, косвенно указывающих на наиболее вероятных возбудителей, имеет крайне важное значение [5].

Согласно имеющимся данным наиболее частой группой факторов риска ИЭ у детей является врождённая патология клапанного аппарата сердца и предшествующее оперативное лечение по данному поводу (табл. 1) [1, 9].

Характер врождённой патологии сердца существенно влияет на риск развития и прогноз ИЭ. Наиболее опасны в данном случае «синие» пороки сердца, комбинированные пороки сердца, а также дефект межжелудочковой стенки [9, 10].

Инъекционная наркомания, в ряде случаев отмечающаяся в подростковой популяции, а также медицинские процедуры, обуславливаю-

щие нарушение целостности сосудистой стенки, предрасполагают к возникновению ассоциированной с *S. aureus* бактериемии [11].

Вместе с тем стоматологические манипуляции, а также хроническая патология зубо-челюстной системы предрасполагают к развитию стрептококковой бактериемии, в ряде случаев к инфекции, вызванной бактериями группы НАСЕК [12].

Подчеркнём также, что приобретённые пороки сердца, являющиеся одним из наиболее значимых ФР при ИЭ во взрослой популяции, у детей клинического значения в данном аспекте не имеют [13].

Этиология

Этиологическая структура ИЭ представлена значительным количеством микроорганизмов, и на сегодняшний день известно более 100 его возбудителей [8]. При этом в подавляющем числе случаев ИЭ, в том числе и в педиатрической практике, вызывается грамположительными микроорганизмами, что подтверждается многочисленными исследованиями (табл. 2) [14–16].

Представленные данные красноречиво отражают тенденцию изменения соотношения основных возбудителей ИЭ, согласно которой ведущим возбудителем описываемой патологии в настоящее время является *S. aureus*. В свою очередь данное обстоятельство обуславливает острый характер течения инфекционной патологии и высокую частоту тромбоэмбологических осложнений [17].

Ещё одной тенденцией в изменении структуры основных возбудителей ИЭ является увеличение выделения коагулазонегативных стафилококков, что объясняется увеличением частоты кардиохирургических оперативных вмешательств и различных инвазивных медицинских манипуляций [8].

Энтерококковая этиология ИЭ в детской популяции встречается гораздо реже по сравнению со взрослыми вследствие меньшего значения у данной категории пациентов таких ФР, как патология желудочно-кишечного тракта и мочевыводящей системы и, соответственно, меньшей потребности в проведении медицинских манипуляций в данных областях [3, 17].

Согласно имеющимся данным у новорождённых детей наиболее частыми возбудителями ИЭ

Таблица 1. Структура факторов риска ИЭ в педиатрической практике

Table 1. Structure of risk factors for infective endocarditis in pediatric practice

Врождённая патология клапанного аппарата сердца	Приобретённая патология, предрасполагающая уязвимости организма	Предшествующие факторы
«Синие» пороки сердца	Иммунодефицит	Стоматологические процедуры
«Не синие» пороки сердца	Онкопатология	Инъекционная наркомания
Дефекты межжелудочковой стенки	Гемодиализ	Инфекции кожи и мягких тканей
Предшествующее оперативное вмешательство на сердце		

Таблица 2. Этиологическая структура ИЭ в педиатрической практике
Table 2. Etiological structure of infective endocarditis in pediatric practice

Микроорганизмы	Исследование			
	D. H. Johnson и соавт. (n=149)	J. M. Martin и соавт. (n=76)	J. A. Stockheim и соавт. (n=111)	M. D. Day и соавт. (n=632)
Годы исследования	1933–1972	1958–1992	1978–1996	2000–2003
Стрептококки группы <i>Viridans</i>	43	38	32	20
<i>S. aureus</i>	33	32	27	57
Коагулазонегативные стафилококки	2	4	12	14
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	4	7	1
Бактерии группы НАСЕК	—	5	4	—
<i>Enterococcus</i> spp.	—	7	4	—

Таблица 3. Длительность антибактериальной терапии при ИЭ в педиатрической практике
Table 3. Duration of antibacterial therapy against infective endocarditis in pediatric practice

Клинический случай	Длительность
Поражение нативных клапанов стрептококковой этиологии	4 нед.
Поражение протезированных клапанов стрептококковой этиологии	6 нед.
Поражение нативных клапанов метициллиночувствительными штаммами стафилококков	4 нед.
Поражение нативных клапанов метициллинорезистентными штаммами стафилококков	4–6 нед.
Поражение протезированных клапанов стафилококковой этиологии	Не менее 6 нед.
Поражение нативных или протезированных клапанов энтерококковой этиологии	4–6 нед.
Поражение нативных или протезированных клапанов энтерококковой этиологии при назначении ванкомицина	6 нед.
Поражение нативных или протезированных клапанов (бактерии группы НАСЕК)	4 нед.
Поражение нативных клапанов без выделения этиологически значимого возбудителя	4 нед.
Поражение протезированных клапанов без выделения этиологически значимого возбудителя	6 нед.
Поражение нативных или протезированных клапанов при выделении энтеробактерий	Не менее 6 нед.

являются *S. aureus*, коагулазонегативные стафилококки, а также *Candida* spp. [1, 3].

Особенности выбора антибактериальной терапии

Основополагающими принципами лечения пациентов с ИЭ являются своевременное назначение антибактериальной терапии и её длительное проведение. При этом предпочтительно применение препаратов с бактерицидной активностью, позволяющее существенно снизить риски возникновения рецидива инфекционного процесса [18, 19].

Согласно данным иностранных источников литературы, комбинированная антибактериальная терапии при ИЭ способствует профилактике рецидивов и снижению длительности терапии. При этом следует отметить, что пациенты с ИЭ имеют потенциально полиорганическую недостаточность, в том числе почечную. В связи с этим, одновременное назначение двух групп антибактериальных препаратов, обладающих нефротоксичностью, существенно повышает риски развития и прогрессирования нефропатии, что диктует необходимость в проведении постоянного мониторинга основных показателей функционирования мочевыводящей системы [18].

В подавляющем большинстве случаев старовая антибактериальная терапия пациентов с ИЭ носит эмпирический характер. В условиях лидирующей позиции *S. aureus* в этиологической

структуре ИЭ следует отметить, что при назначении старовой терапии следует отдавать предпочтение препаратам, активным в отношении данного возбудителя [8, 18].

Учитывая возможность образования биоплёнок при ИЭ протезированных клапанов, с целью повышения эффективности антибактериальной терапии рекомендуется добавление рифампicina, способствующего их разрушению [18].

Длительность антибактериальной терапии пациентов с ИЭ в педиатрической практике составляет 4–6 нед., в случае поражения протезированных клапанов может достигать 8 нед. (табл. 3) [3, 18].

Учитывая указанную выше длительность антибактериальной терапии, на сегодняшний день имеются данные о потенциальной возможности применения амбулаторной парентеральной терапии у пациентов с ИЭ. При этом следует отметить, что данный вид терапии имеет существенные ограничения, и она допустима лишь тогда, когда у изначально госпитализированного пациента отмечается положительная динамика, отсутствуют серьёзные риски развития осложнений и существуют необходимые условия ухода за пациентом в амбулаторных условиях [20, 21].

В разработанных клинических рекомендациях, касающихся вопросов введения пациентов с ИЭ, отмечено, что в случае развития инфекционного процесса, не поддающегося контролю при назначении антибактериальной терапии, необходимо прибегать к хирургическому лечению. Вме-

сте с тем, при выборе данного метода лечения следует принимать во внимание тот факт, что качество жизни терапевтически пролеченных пациентов значительно выше по сравнению с пациентами, перенёсшими оперативное вмешательство на клапанном аппарате сердца и вынужденных впоследствии получать антикоагулянты [23].

Заключение

Своевременное назначение адекватной антибактериальной терапии у пациентов с ИЭ способствует кардинальному снижению смертности и излечению с минимальными изменениями клапанного аппарата сердца, что особенно актуально при оказании медицинской помощи детскому контингенту.

С появлением современных антибактериальных препаратов врачи получили возможность проведения эффективной терапии инфекций, вызванных полирезистентными возбудителями. В случае ИЭ особенно важно наличие выраженной бактерицидной активности у потенциально назначаемых антибактериальных препаратов.

Литература/References

1. Gupta S, Sakhija A, McGrath E, Asmar B. Trends, microbiology, and outcomes of infective endocarditis in children during 2000–2010 in the United States. *Congenit Heart Dis.* 2017; 12 (2): 196–201. doi: 10.1111/chd.12425.
2. Mahony M, Lean D, Pham L, Horvath R, Suna J, Ward C et al. Infective endocarditis in children in Queensland, Australia: epidemiology, clinical features and outcome. *Pediatric Infect J.* 2021; 40: 617–622. doi: 10.1097/INF.00000000000003110.
3. Baltimore R.S., Chair M.G., Baddour L.M., Lee B.B., Jackson M.A., Lockhart P.B. et al. Infective endocarditis in childhood: 2015 Update A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2015; 132: 1487–1515. doi: 10.1161/CIR.0000000000000298
4. Russell H.M., Johnson S.L., Wurlitzer K.C., Backer C.L. Outcomes of surgical therapy for infective endocarditis in a pediatric population: a 21-year review. *Annals of Thoracic Surgery.* 2013; 96: 171–174. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.02.031.
5. Данилов А.И., Козлов Р.С., Ляметц Л.Л. Структура факторов риска инфекционного эндокардита в Российской Федерации. *Вестник СТМА.* 2018; 17 (4): 107–111. [Danilov A.I., Kozlov R.S., Lyamets L.L. Struktura faktorov riska infekcionnogo endokardita v Rossiijskoj Federacii. *Vestnik SGMA.* 2018; 17 (4): 107–111. (in Russian)]
6. Данилов А.И., Козлов С.Н. Общие принципы ведения пациентов с инфекционным эндокардитом. Клиническая фармакология и терапия 2019; 28 (2): 57–60. [Danilov A.I., Kozlov S.N. Obschie principy vedeniya pacientov s infekcionnym endokarditom. *Klinicheskaya Farmakologiya i Terapiya* 2019; 28 (2): 57–60. (in Russian)]
7. Cancan Gursul N., Vardar I., Demirdal T., Gursul E., Ural S., Yesil M. Clinical and microbiological findings of infective endocarditis. *Journal of Infection in Developing Countries.* 2016; 10 (5): 478–487. doi: 10.3855/jidc.7516.
8. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В., Власова Е.Е., Данилова Е.М., Дехнич А.В. и соавт. Этиология инфекционного эндокардита в России. Клин микробиол антимикроб химиотер. 2015; 17 (1): 4–10. [Danilov A.I., Alekseeva I.V., Asner T.V., Vlasova E.E., Danilova E.M., Dehnich A.V. i soavt. Jetiologija infekcionnogo jendokardita v Rossii. *Klin Mikrobiol Antimikrob Himioter.* 2015; 17 (1): 4–10. (in Russian)]
9. Jortveit J., Klcovansky J., Eskedal L., Birkeland S., Dohlen G., Holmstrom H. Endocarditis in children and adolescents with congenital heart defects: a Norwegian nationwide register-based cohort study. *Arch Dis Child.* 2018; 103: 670–674. doi: 10.1136/archdischild-2017-313917. *Epub* 2018 Mar 6.
10. Cahill T.J., Jewell P.D., Denne L., Franklin R.C., Frigola A., Orchard E., Prendergast B.D. Contemporary epidemiology of infective endocarditis in patients with congenital heart disease: a UK prospective study. *Am Heart J.* 2019; 215: 70–77. doi: 10.1016/j.ahj.2019.05.014.
11. Martin J.M., Neches W.H., Wald E.R. Infective endocarditis: 35 years of experience at a children's hospital. *Clin Infect Dis.* 1997; 24: 669–675. doi: 10.1093/clind/24.4.669.
12. Lin Y.T., Hsieh K.S., Chen Y.S., Huang I.F., Cheng M.F. Infective endocarditis in children without underlying heart disease. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013; 46: 121–128. doi: 10.1016/j.jmii.2012.05.001.
13. Rosenthal L.B., Feja K.N., Levasseur S.M., Alba L.R., Gersony W., Saiman L. The changing epidemiology of pediatric endocarditis at a children's hospital over seven decades. *Pediatr Cardiol.* 2010; 31: 813–820. doi: 10.1007/s00246-010-9709-6.
14. Johnson D.H., Rosenthal A., Nadas A.S. A forty-year review of bacterial endocarditis in infancy and childhood. *Circulation.* 1975; 51: 581–588. doi: 10.1161/01.cir.51.4.581.
15. Stockheim J.A., Chadwick E.G., Kessler S., Amer M., Abdel-Haq N., Dajani A.S., Shulman S.T. Are the Duke criteria superior to the Beth Israel criteria for the diagnosis of infective endocarditis in children? *Clin Infect Dis.* 1998; 27: 1451–1456. doi: 10.1086/515021.
16. Day M.D., Gauvreau K., Shulman S., Newburger J.W. Characteristics of children hospitalized with infective endocarditis. *Circulation.* 2009; 119: 865–870. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.798751.
17. Vicent L., Goenaga M.A., Munoz P., Marin-Arriaza M., Valerio M., Farinas M.C., Cobo-Belaustegui M. et al. Infective endocarditis in children and adolescents: a different profile with clinical implications. *Pediatr Res.* 2022; 92 (5): 1400–1406. doi: 10.1038/s41390-022-01959-3.
18. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongiorni M.G., Casalta J.P., Del Zotti F. et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: the task force for the management of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J.* 2015; 36: 3075–3128. doi: 10.1093/eurheartj/ehv319.
19. Pettersson G.B., Hussain S.T. Current AATS guidelines on surgical treatment of infective endocarditis. *Ann Cardiothorac Surg.* 2019; 8 (6): 630–644. doi: 10.21037/acs.2019.10.05.
20. Hendarto A., Putri N.D., Yunita D.R., Efendi M., Prayitno A., Karyanti M.R. et al. First pediatric outpatient parenteral antibiotic therapy clinic in Indonesia. *Front Pediatr.* 2020; 8: 156. doi: 10.3389/fped.2020.00156.
21. Rajaratnam D., Rajaratnam R. Outpatient antimicrobial therapy for infective endocarditis is safe. *Heart Lung Circ.* 2021; 30: 207–215. doi: 10.1016/j.hlc.2020.08.016.
22. Khoob B., Buratto E., Fricke T.A., Gelbart B., Brizard C.P., Brink J. et al. Outcomes of surgery for infective endocarditis in children: a 30-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2019; 158 (5): 1399–1409. doi: 10.1016/j.jtcvs.2019.06.024.

В подавляющем большинстве случаев длительность антибактериальной терапии пациентов с ИЭ в педиатрической практике составляет 4–6 нед., что обуславливает необходимость в проведении регулярного мониторинга эффективности и безопасности проводимой схемы терапии.

Согласно разработанным клиническим рекомендациям, выбор антибактериальной терапии при ИЭ, в том числе и в педиатрической практике, в зависимости от вида микроорганизма и клинической ситуации. Вместе с тем, с учётом усугубляющейся проблемы антибиотикорезистентности, необходимо продолжить исследования, направленные на оптимизацию процесса диагностики и режимов антибактериальной терапии пациентов с ИЭ.

С целью повышения эффективности терапии в ходе лечения пациентов с ИЭ рекомендуется привлекать специалистов различного профиля, включая кардиолога, врача функциональной диагностики, микробиолога, клинического фармаколога и кардиохирурга.

Информация об авторах

Данилов Андрей Игоревич — к. м. н., доцент кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6894-2462

Евсеев Андрей Викторович — д. м. н., профессор, заведующий научно-исследовательским центром, заведующий кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7296-8502

Авдеева Татьяна Григорьевна — д. м. н., профессор кафедры поликлинической педиатрии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7078-1269

Легонькова Татьяна Ивановна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой пропедевтики детских болезней и факультетской педиатрии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9401-2579

Жаркова Людмила Павловна — д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет», Смоленск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0036-5898

About the authors

Andrey I. Danilov — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Clinical Pharmacology, Smolensk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Smolensk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6894-2462

Andrey V. Evseev — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Research Center, Head of the Department of Normal Physiology, Smolensk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Smolensk, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7296-8502

Tatyana G. Avdeeva — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Outpatient Pediatrics, Smolensk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Smolensk, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7078-1269

Tatyana I. Legonkova — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Propaedeutics of Childhood Diseases and Faculty Pediatrics, Smolensk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Smolensk, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9401-2579

Lyudmila P. Zharkova — D. Sc. in Medicine, Professor, Department of clinical pharmacology, Smolensk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Smolensk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0036-5898

Ренессанс спирамицина в клинической практике

*С. В. ЯКОВЛЕВ, М. П. СУВОРОВА

Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия
ГКБ им. С. С. Юдина ДЗМ, Москва, Россия

The Renaissance of Spiramycin in Clinical Practice

*SERGEY V. YAKOVLEV, MARGARITA P. SUVOROVA

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia
City Clinical Hospital named after S. S. Yudin, Moscow, Russia

Резюме

Спирамицин является природным 16-членным макролидным антибиотиком, который применяется в медицине около 70 лет. Несмотря на свою длительную историю, спирамицин сохраняет крепкие позиции в клинической практике, причём устойчивость к нему основных респираторных и урогенитальных патогенов ниже, чем к 14- и 15-членным макролидам. Интерес к спирамицину обусловлен тем, что по своим физико-химическим и фармакокинетическим свойствам он сходен с последними полусинтетическими макролидами и лишён недостатков эритромицина. Особые биологические свойства спирамицина объясняют его стабильно высокую клиническую эффективность в течение 70 лет клинического применения при различных инфекциях. Следует подчеркнуть особую уникальность спирамицина как антибиотика с наличием не только прямого воздействия на микробы, но и неантибиотических свойств. Это позволило экспертам в своё время заявить о «парадоксе» спирамицина, то есть о наличии более высокой реальной клинической эффективности, чем ожидаемой по данным исследований *in vitro*. К таким свойствам спирамицина можно отнести проантибиотический и постантибиотический эффекты, иммуномодулирующее действие, высокие внутриклеточные и внеклеточные концентрации антибиотика. В обзоре обсуждаются antimикробные, фармакокинетические и фармакодинамические характеристики спирамицина и его место при лечении различных инфекций — респираторных, ЛОР-органов, урогенитальных, гинекологических, стоматологических.

Ключевые слова: спирамицин; макролиды; antimикробная активность; фармакокинетика; иммуномодулирующее действие; постантибиотический эффект; проантибиотический эффект; клиническое применение; безопасность

Для цитирования: Яковлев С. В., Суторова М. П. Ренессанс спирамицина в клинической практике. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68: 7–8: 83–89. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-83-89>.

Abstract

Spiramycin is a natural 16-membered macrolide antibiotic that has been used in clinical practice for about 70 years. Despite long-term use, spiramycin retains its position in clinical practice; the resistance of the main respiratory and urogenital pathogens is lower to spiramycin than to 14- and 15-membered macrolides. The interest in spiramycin is due to the fact that its physico-chemical and pharmacokinetic properties are similar to the last semi-synthetic macrolides, and it lacks the disadvantages of erythromycin. Special biological properties of spiramycin explain its consistently high clinical efficacy that has lasted for 70 years of clinical use in various infections. It is necessary to emphasize the uniqueness of spiramycin as an antibiotic with not only the direct effect on microbes, but also non-antibiotic properties. This allowed the experts at the time to declare the «paradox» of spiramycin — the presence of a higher real clinical efficacy than expected according to *in vitro* studies. Such properties of spiramycin include pro-antibiotic and post-antibiotic effects, immunomodulatory effect, as well as high intracellular and extracellular concentrations of the antibiotic. The review discusses antimicrobial, pharmacokinetic, and pharmacodynamic characteristics of spiramycin and its place in the treatment of various infections — respiratory, ENT, urogenital, gynecological, and dental.

Keywords: spiramycin; macrolides; antimicrobial activity; pharmacokinetics; immunomodulatory properties; post-antibiotic effect; pro-antibiotic effect; clinical use; safety

For citation: Yakovlev S. V., Suvorova M. P. The renaissance of spiramycin in clinical practice. *Antibiotiki i Khimioter* = *Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 7–8: 83–89. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-83-89>.

Макролидные антибиотики около 70 лет применяются в медицине. Первый препарат этого класса — эритромицин — был внедрён в практику

в 1952 г., спустя три года появились ещё два препарата — спирамицин и олеандомицин; следующее «пополнение» класса макролидов произошло су-

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: Коломенский пр., д. 4, ГКБ им. С. С. Юдина, г. Москва, Россия, 115446.
E-mail: antimicrob@yandex.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 4 Kolomensky Drive, City Clinical Hospital named after S. S. Yudin, Moscow, 115446 Russia.
E-mail: antimicrob@yandex.ru

щественно позже, в 1990-х гг., когда интерес к этим антибиотикам увеличился и их использование в клинике расширилось за счёт новых показаний.

Основная причина повышения интереса к макролидам связана с увеличением частоты атипичных микроорганизмов при инфекциях дыхательных путей и мочеполовой системы. Эти микроорганизмы персистируют внутри клеток макроорганизма и недоступны для многих антибиотиков, прежде всего, бета-лактамов и аминогликозидов. Также можно указать на новые заболевания и новые возбудители, такие как *Legionella*, оппортунистические возбудители при СПИДе, *Helicobacter pylori*.

В настоящее время известно более 20 макролидных антибиотиков, из них 7 применяются в клинической практике. Имеются природные и полусинтетические макролиды. В основе химической структуры макролидов лежит макролактонное кольцо. В зависимости от количества атомов углерода в кольце выделяют 14-членные, 15-членные и 16-членные макролиды (табл. 1). Эта химическая классификация имеет большое клиническое значение в плане механизмов развития устойчивости к макролидам.

Наиболее хорошо изучена группа 14-членных макролидов, среди которых первый представитель этого класса — эритромицин. Недостатками эритромицина является низкая стабильность в кислой среде, в связи с чем он плохо всасывается при приёме внутрь, характеризуется быстрой элиминацией, что требует частого дозирования, достаточно большое количество побочных эффектов и риск нежелательных взаимодействий с другими лекарствами. Эти недостатки, ограничивающие применение эритромицина, с одной стороны, способствовали поиску новых, более оптимальных и безопасных препаратов в ряду 14-членных макролидов (в результате были синтезированы кларитромицин и рокситромицин и ещё ряд препаратов), с другой стороны, способствовали переоценке и более углублённому изучению уже имеющихся и давно применяющихся природных 16-членных макролидов. Среди последних наибольший интерес вызывает спирамицин, выделенный из *Streptomyces ambofaciens* в лаборатории фирмы Rhone-Poulenc в 1954 г.

Интерес к спирамицину обусловлен тем, что по своим физико-химическим и фармакокинети-

ческим свойствам он сходен с последними полусинтетическими макролидами и лишён недостатков эритромицина. Особые биологические свойства спирамицина объясняют его стабильно высокую клиническую эффективность в течение 70 лет клинического применения при различных инфекциях. Следует подчеркнуть особую уникальность спирамицина как антибиотика с наличием не только прямого воздействия на микробы, но и неантибиотических свойств. Это позволило экспертам в своё время заявить о «парадоксе» спирамицина. Характеристика спирамицина хорошо представлена в обзора [1–3] и монографии [4].

Антимикробная активность

Спирамицин является природным антибиотиком и представляет собой смесь трёх разных спирамицинов (Спирамицин I, II и III), отличающихся по характеру радикала в положении 3-го лактонного кольца. Спирамицин I или 3-гидроксиспирамицин является основным в препарате, на его долю в весовом отношении приходится 85%, и именно он определяет антимикробные и фармакокинетические характеристики лекарственного средства.

Механизм действия макролидных антибиотиков связан с ингибированием синтеза белка бактериальной клеткой. Спирамицин подавляет синтез белка на уровне рибосом, связываясь с 50S-субъединицей рибосом и вызывая диссоциацию между рибосомой и пептидил-tРНК.

Спирамицин, как и другие макролиды, действует на микробную клетку бактериостатически, однако в отношении некоторых микроорганизмов отмечается бактерицидный эффект при концентрациях в 2–4 раза превышающих МПК [5]. Бактерицидная активность спирамицина отмечена в отношении стрептококков группы А, пневмококков, нейссерий, *Bordetella pertussis*, некоторых штаммов стафилококков [6].

Спектр антимикробной активности спирамицина аналогичен эритромицину и другим макролидам и включает грамположительные бактерии (стафилококки, стрептококки, пневмококки, энтерококки, листерии, коринебактерии), некоторые грамотрицательные бактерии (*Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria* spp., *Legionella pneumophila*, *Moraxella* ca-

Таблица 1. Классификация макролидных антибиотиков
Table 1. Classification of macrolide antibiotics

14-членные макролиды	15-членные макролиды	16-членные макролиды
Природные:	Полусинтетические:	Природные:
Эритромицин	Азитромицин	Джозамицин
Полусинтетические:		Мидекамицин
Кларитромицин		Спирамицин
Рокситромицин		

tarthalis), спирохеты (*Borrelia burgdorferi*), анаэробы (*Peptostreptococcus* spp., *Propionbacterium acne*), атипичные микроорганизмы (*Chamydophila pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*), а также некоторые простейшие — *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*.

Наибольшая активность спирамицина наблюдается в отношении грамположительных стрептококков, пневмококков, оксациллиночувствительных стафилококков. В отношении грамположительных микроорганизмов 16-членные макролиды проявляют более высокую природную активность по сравнению с 14-членными макролидами; спирамицин и джозамицин проявляют сходную активность [7, 8]. Активность 16-членных и других макролидов в отношении стафилококков практически одинаковая.

В последние годы наблюдается существенный рост устойчивости пневмококков к макролидным антибиотикам во всех регионах мира, в том числе, России [9]. Следует особо отметить, что уровень устойчивости к 14-членным макролидам и азитромицину всегда выше по сравнению с устойчивостью к 16-членным макролидам, в частности, спирамицину. При оценке чувствительности стрептококков и пневмококков маркером устойчивости к 16-членным макролидам является устойчивость к клиндамицину. Так, в одной отечественной работе устойчивость *S. pneumoniae* к эритромицину составила 14,3%, а к клиндамицину — 9%, устойчивость *S. pyogenes* к эритромицину — 7,1%, а к клиндамицину — 0,6% [10]. В другой работе показаны сходные результаты: устойчивость *S. pneumoniae* к эритромицину была в два раза выше (31,8%), чем к клиндамицину (14,8%) [11].

Таким образом, устойчивость пневмококков и стрептококков группы А к 14-членным макролидам и азитромицину всегда выше, чем к спирамицину, что связано с разными механизмами резистентности. Устойчивость пневмококков и стрептококков к макролидам реализуется двумя механизмами. Первый — метилирование рибосомы, в этом случае наблюдается устойчивость ко всем макролидам и линкозамидам (MLS фенотип). Второй — активация эффлюксной помпы, но в этом случае развивается устойчивость к эритромицину, кларитромицину и азитромицину, но сохраняется чувствительность к 16-членным макролидам и клиндамицину. Следовательно, для лечения респираторных инфекций, где ведущими возбудителями являются пневмококк и бета-гемолитический стрептококк группы А предпочтительнее использовать 16-членные макролиды, в частности, спирамицин.

В отношении атипичных микроорганизмов спирамицин проявляет высокую природную активность со значениями МПК < 1 мг/л. Активность спирамицина *in vitro* в отношении хлами-

дий уступала кларитромицину и азитромицину, однако в опытах *in vivo* активность спирамицина значительно увеличивалась, и эти различия нивелировались [12].

Факторы, влияющие на активность спирамицина *in vitro*

Постантибиотический эффект (ПАЭ). ПАЭ определяют как продолжающееся подавление роста бактерий *in vitro* при удалении антибиотика из среды. Клиническое значение ПАЭ может заключаться в том, что некоторые антибиотики могут назначаться с более длительными интервалами между дозами, чем рассчитанные на основании периода полувыведения, а также в более выраженном бактериостатическом действии, чем предсказанным на основании значений МПК.

В отличие от бета-лактамов, для макролидов характерен длительный ПАЭ в отношении грамположительных бактерий, причём ПАЭ более выражен у 16-членных макролидов. Продолжительность ПАЭ спирамицина для стрептококков и пневмококков составляет от 4 до 9 ч, а для стафилококков — около 9 ч [5, 8, 13].

Ещё одно важное значение ПАЭ заключается в индуцированном снижении вирулентности микробов в этот период в результате нарушения адгезии, снижения тканевой инвазии и изменения чувствительности бактерий к фагоцитозу. В результате в период ПАЭ микроорганизмы *in vitro* более подвержены бактерицидному действию нейтрофилов [14].

Проантибиотический эффект. В низких концентрациях (менее МПК) антибиотики не обладают бактерицидным или бактериостатическим действием, однако могут влиять на структуру и функциональную активность бактериальной клетки. В эксперименте показано, что некоторые антибактериальные препараты в субингибирующих концентрациях изменяют морфологию бактериальной клетки, снижают вирулентность бактерий и делают их более подверженными фагоцитозу макрофагами и нейтрофилами.

В исследовании J. F. Desnottes с соавт. [14] показано, что спирамицин в субингибирующих концентрациях (от 1/1024 до 1/2 МПК) нарушает адгезию стафилококков и стрептококков к клеткам слизистой полости рта человека. Спирамицин в концентрации 1/4 МПК вызывал увеличение фагоцитарной способности полиморфноядерных нейтрофилов против стрептококков и стафилококков. Сходные данные о наличии у спирамицина проантибиотического эффекта приводятся в других исследованиях [8, 13, 15].

Влияние спирамицина на иммунитет. Влияние антибиотиков на специфические и не-

специфические защитные реакции макроорганизма является важным компонентом противовирусной резистентности. Большинство антибиотиков не оказывают существенного влияния на иммунный ответ макроорганизма на инфекцию. Умеренные иммуномодулирующие свойства показаны для некоторых цефалоспоринов (цефодизим) и макролидов.

Влияние макролидных антибиотиков на фагоцитоз и специфический иммунный ответ анализируется в работе M. T. Labro [8]. Некоторые 14-членные макролиды нарушают окислительные процессы в клетке, азитромицин не влияет, а 16-членные макролиды, в частности, спирамицин улучшают эти процессы. Показано увеличение фагоцитоза и хемотаксиса *in vitro* под влиянием спирамицина. Сходные данные о положительном влиянии спирамицина на иммунный ответ макроорганизма приводят и другие авторы [14, 15]. В недавно опубликованном исследовании показано, что спирамицин ингибирует продукцию макрофагами провоспалительных медиаторов и цитокинов, в частности, снижаются концентрации NO, IL-1, IL-6 [16]. Это может свидетельствовать об оптимизации воспалительного ответа макроорганизма на инфекцию под влиянием спирамицина и профилактики развития эндотелиального повреждения, что является краеугольным камнем в генезе тканевого повреждения при сепсисе.

Фармакокинетика

Спирамицин хорошо всасывается при приёме внутрь, и абсолютная биодоступность составляет в среднем 36% [17]. Максимальные концентрации препарата в крови после однократного приёма внутрь в дозе 3 и 6 млн МЕ составили 0,96 и 1,65 мг/л.

Фармакокинетика спирамицина изучена в ряде исследований и проанализирована в обзорных работах [2–4, 18]. Фармакокинетические параметры спирамицина в сравнении с другими макролидами приведены в табл. 2 [3, 4].

Следует выделить наиболее важные отличия фармакокинетики спирамицина.

1. Концентрации спирамицина в крови выше по сравнению с концентрациями азитромицина. Это имеет важное значение при инфекциях, сопровождающихся бактериемией. В инструкции FDA азитромицина указано, что азитромицин не следует назначать при пневмонии с бактериемией, так как в этом случае сложно рассчитывать на эрадикацию возбудителя из крови. Концентрации спирамицина в крови достаточны для эрадикации чувствительных микроорганизмов.

2. Спирамицин, по сравнению с другими макролидами, в незначительной степени связывается с белками плазмы: 17% с альбумином и 6% с альфа1-кислым гликопротеином. Это критически важно у пациентов с гипоальбуминемией, которая может наблюдаться при сепсисе, нарушении функции печени и почек, тяжёлыми коморбидными состояниями. У таких пациентов следует прогнозировать более надёжную клиническую эффективность спирамицина в сравнении с другими макролидами.

3. Спирамицин имеет большой объём распределения, что свидетельствует о хорошей проникновении антибиотика не только в ткани, но и в клетки макроорганизма. Более высокий объём распределения отмечен только у азитромицина, но показатель объёма распределения азитромицина слишком высокий, что свидетельствует о том, что антибиотик в организме человека кумулирует исключительно внутриклеточно, что сопровождается низкими концентрациями в крови и, возможно, в интерстициальной жидкости. В этом отношении объём распределения спирамицина более сбалансирован.

4. Важной особенностью тканевой фармакокинетики спирамицина является то, что терапевтические концентрации препарата сохраняются в течение длительного времени — дольше, чем при применении других макролидов. Высокая способность спирамицина проникать в

Таблица 2. Фармакокинетические параметры макролидных антибиотиков [3, 4]
Table 2. Pharmacokinetic parameters of macrolide antibiotics [3, 4]

Параметры	Спирамицин (6 млн МЕ)	Эритромицин (500 мг)	Кларитромицин (500 мг)	Азитромицин (500 мг)
C_{max} , мг/л	1,3–3,3	1,8–3	1,8–3,5	0,4–0,6
Биодоступность, %	33–39	10–30	30–55	37
Vd_{ss} , л	383–408	20–30	240	1500
Связь с белком, %	23	65–90	42–70	40
$T_{1/2}$, ч	4,5–6,2	2	2,6–4,9	10–40
Активные метаболиты	Нет	Нет	Есть	Нет

Примечание. C_{max} — максимальные концентрации в крови; Vd_{ss} — объём распределения стационарной фазы; $T_{1/2}$ — период полувыведения.

Note. C_{max} — maximum concentrations in the blood; Vd_{ss} — steady-state volume of distribution; $T_{1/2}$ — half-life

ткани связана с его липофильными свойствами и низкой степенью ионизации, что позволяет легко проходить через биологические мембранны, а длительная кумуляция в тканях — с отсутствием метаболизма в тканях и клетках [19].

5. В отличие от эритромицина и джозамицина, спирамицин в значительно меньшей степени метаболизирует в организме и не взаимодействует с оксидазной системой цитохрома Р-450, в результате чего спирамицин не влияет на метаболизм других лекарств.

6. Фармакокинетика спирамицина не изменяется при нарушении функции экскреторных органов (почки, печень), поэтому не требуется коррекции дозы антибиотика у больных с хронической болезнью почек и циррозом печени.

Современные позиции спирамицина в медицине

Спирамицин применяется в клинической практике более 60 лет и зарекомендовал себя как эффективный и безопасный антибиотик. За этот период накоплен большой клинический опыт его применения у различных категорий больных, в том числе у беременных женщин и пожилых пациентов. Опыт клинического применения спирамицина представлен в мировой научной литературе [1, 2, 20–24], а также в отечественных публикациях [25–29].

Ввиду широкого спектра антимикробной активности спирамицина при хорошей тканевой и клеточной пенетрации он эффективно применяется для лечения инфекций различной локализации:

- инфекции верхних и нижних дыхательных путей в терапевтической практике;
- острый риносинусит, острый средний отит, острый тонзиллофарингит; в том числе атипичной этиологии;
- негонококковый уретрит, бактериальный простатит, особенно хламидийный;
- урогенитальный хламидиоз, воспалительные заболевания органов малого таза (в комбинации с бета-лактамами), токсоплазмоз у беременных;
- неосложнённые инфекции кожи и мягких тканей: пиодермия, рожа, фурункулы, импетиго, эритразма;
- инфекции полости рта и периодонта: стоматит, периодонтит, гингивит, остеит;
- токсоплазмоз, Лайм-боррелиоз, диарея, вызванная *Cryptosporidium* у ВИЧ инфицированных пациентов.

Антибиотик спирамицин в настоящее время производится компанией World Medicine и выпускается под торговым названием Дорамитцин ВМ (Doramycin WM) в таблетках, содержащих

3 млн МЕ. Суточная доза спирамицина составляет 6 млн МЕ. В случае тяжёлой инфекции, токсоплазмозе суточная доза может быть увеличена до 9 млн МЕ.

Спирамицин хорошо переносится. У спирамицина отсутствуют такие серьёзные побочные эффекты, как удлинение интервала QT на ЭКГ с риском развития пароксизмальной желудочковой тахикардии и внезапной смерти (характерно для азитромицина и кларитромицина), гепатотоксичность (характерна для азитромицина, кларитромицина, эритромицина), прокинетический эффект с развитием диареи (характерен для эритромицина).

Важно представить правильное позиционирование спирамицина при лечении наиболее актуальных инфекций в амбулаторной практике.

Инфекции верхних дыхательных путей. Острый тонзиллофарингит стрептококковой этиологии: спирамицин является препаратом выбора в случае аллергии к пенициллинам;

Острый риносинусит и острый средний отит: препарат выбора при аллергии к бета-лактамам и препарат второй линии при недостаточной эффективности бета-лактамов.

Инфекции нижних дыхательных путей. Острый бактериальный бронхит: спирамицин может рассматриваться как антибиотик первой линии терапии, наряду с бета-лактамами, так как в этиологии заболевания, наряду с пневмококком, большое значение имеет микоплазма.

Внебольничная пневмония: Антибиотик второй линии при нетяжёлом течении (добавляется к амоксициллину на 2–3 день терапии в случае отсутствия положительного эффекта); более основано назначение спирамицина у подростков и взрослых до 40 лет.

Атипичная пневмония, вызванная *M. pneumoniae* или *C. pneumoniae*: спирамицин — антибиотик первой линии терапии в случае документированной или предполагаемой атипичной этиологии. Клинические признаки микоплазменной пневмонии:

- постепенное начало с симптомов инфекции верхних дыхательных путей;
- преобладание малопродуктивного кашля без дыхательной недостаточности;
- стабильное состояние пациента;
- двустороннее интерстициальное поражение лёгких на рентгенограмме или КТ;
- вспышки респираторной инфекции в организованных коллективах.

Следует помнить, что при инфекциях нижних дыхательных путей спирамицин, как 16-членный макролид, предпочтительнее использовать, чем азитромицин и кларитромицин, так как характеризуется меньшим уровнем устойчивости *S. pneumoniae*.

Заключение: «Парадокс» спирамицина

Спирамицин является природным 16-членным макролидным антибиотиком. В многочисленных исследованиях показана высокая эффективность спирамицина при лечении различных бактериальных инфекций. Однако хорошие результаты применения препарата в клинике не всегда согласуются с данными, полученными *in vitro*: некоторые возбудители инфекций характеризуются сниженной чувствительностью к спирамицину; есть устойчивые штаммы; в отношении ряда возбудителей респираторных инфекций и урогенитальных инфекций антибиотик уступает другим макролидам. Кроме того, стационарные концентрации спирамицина в крови (0,5–1,5 мг/л) обычно ниже значений МПК для наиболее актуальных патогенов.

В то же время, в исследованиях, проведённых *in vivo* и в клинике, показано, что клиническая эффективность спирамицина не уступает другим макролидам, а иногда превосходит их, в том числе в случае слабочувствительных микроорганизмов. Это несопадение вызвало большой интерес специалистов и позволило говорить о «феномене» или «парадоксе» спирамицина [1, 3, 4].

Можно выделить следующие факторы, объясняющие повышенную активность спирамицина *in vivo* и надёжную эффективность.

- **Высокие и длительно сохраняющиеся тканевые концентрации** спирамицина — одна из причин высокой клинической эффективности антибиотика, применяемого в обычной дозе, даже в случае слабочувствительных микроорганизмов.

- **Высокие внутриклеточные концентрации.** При применении спирамицина создаются высокие и длительно сохраняющиеся концентрации антибиотика в клетках макроорганизма, при этом концентрации препарата в альвеолярных макрофагах и полиморфноядерных нейтрофилах в 20–30 раз превышают внеклеточные. Накапливаясь в тканевых и циркулирующих макрофагах, спирамицин проникает с ними в очаг инфекции, где создаются высокие бактерицидные концентрации препарата.

- **Медленное высвобождение из клеток.** Концентрации спирамицина в тканях длительно сохраняются на терапевтическом уровне в результате медленного высвобождения из клеток.

- **Стимуляция защитных сил макроорганизма.** В эксперименте на животных и культуре клеток показано, что спирамицин обладает иммуномодулирующими свойствами, характеризующимися усилением хемотаксиса, адгезии и фагоциторной активности нейтрофилов. Также принципиально

важно, что спирамицин ингибирует продукцию макрофагами провоспалительных медиаторов и цитокинов, в частности, снижаются концентрации NO, IL-1, IL-6, что реализуется в оптимизации иммунного ответа и профилактике тканевых и эндотелиальных повреждений.

- **Постантибиотический эффект.** Для спирамицина характерен длительный ПАЭ, выраженный в большей степени, чем у 14-членных макролидов и азитромицина. Это объясняет более стабильное и надёжное подавление патогенов, несмотря на слабую их чувствительность к антибиотику *in vitro*.

- **Проантибиотический эффект.** Эффект подавления бактерий в субингибирующих концентрациях, что снижает функциональную активность микробы и его вирулентность.

Таким образом, перечисленные свойства спирамицина объясняют высокую бактерицидную активность и надёжную клиническую эффективность антибиотика, в том числе в отношении слабочувствительных и умеренно резистентных микробов.

В заключение следует резюмировать, что в арсенале врачей нашей страны вновь стал доступен хорошо изученный, надёжный и безопасный природный 16-членный макролидный антибиотик спирамицин, к которому наблюдается меньшая устойчивость грамположительных бактерий, по сравнению с 14- и 15-членными макролидами. Учитывая приведённые выше данные, можно говорить о «ренессансе» спирамицина, так как антибиотик сохраняет такую же эффективность, как и 50–70 лет назад в период его дебюта в медицине. Таким феноменов могут похвастаться только небольшое число из ранних антибиотиков.

Особо хочется подчеркнуть безопасность спирамицина, отсутствие лекарственных взаимодействий, отсутствии риска кардиотоксичности и гепатотоксичности, что возможно при применении азитромицина и кларитромицина, безопасность применения у беременных женщин с первого триместра. Режим дозирования спирамицина не требует коррекции при патологии почек и печени, у пожилых пациентов.

Во многих клинических ситуациях врачу следует выбрать более надёжный и безопасный макролидный антибиотик спирамицин по сравнению с другими 14- и 15-членными макролидами. Это, прежде всего, беременные женщины, пациенты с коморбидностью и принимающие другие лекарственные препараты (минимальный риск взаимодействий), пациенты с заболеваниями сердца и удлинённым интервалом QT на ЭКГ, пациенты с нарушенной функцией печени или почек, а также пациенты, у которых в анамнезе был неуспех при применении 14- или 15-членных макролидов.

Литература/References

- Smith C.R. The spiramycin paradox. *J Antimicrob Chemother.* 1988 Jul; 22 Suppl B: 141–144. doi: 10.1093/jac/22.supplement_b.141.
- Rubinstein E., Keller N. Spiramycin renaissance. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Nov; 42 (5): 572–576. doi: 10.1093/jac/42.5.572.
- Яковлев С.В., Суторова М.П. Природный макролидный антибиотик спирамицин: антимикробная активность, фармакокинетика и клиническое применение. *Клиническая геронтология.* 1997; 2: 46–53. [Yakovlev S.V., Suvorova M.P. Prirodnyj makrolidnyj antibiotik spiramitsin: antimikrobnaya aktivnost', farmakokinetika i klinicheskoe primenenie. *Klinicheskaya Gerontologiya.* 1997; 2: 46–53. (in Russian)]
- Спирамицин. Монография. С.В. Яковлев. М.: Rhone-Poulenc Rorer, 1997; 72. [Spiramitsin. Monografiya. S.V. Yakovlev. Moscow: Rhone-Poulenc Rorer, 1997; 72.
- Chabbert Y.A. Early studies on *in-vitro* and experimental activity of spiramycin: a review. *J Antimicrob Chemother.* 1988 Jul; 22 Suppl B: 1–11. doi: 10.1093/jac/22.supplement_b.1.
- Brisson-Noël A., Trieu-Cuot P., Courvalin P. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J Antimicrob Chemother.* 1988 Jul; 22 Suppl B: 13–23. doi: 10.1093/jac/22.supplement_b.13.
- Klugman K.P., Capper T., Widdowson C.A. *et al.* Increased activity of 16-membered lactone ring macrolides against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of South Africa pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 729–734.
- Labro M.T. Pharmacology of spiramycin in comparison with other macrolides. *Drug Invest.* 1993; 6: Suppl 1: 15–28.
- Яковлев С.В. Осторожно, азитромицин! Вестник практического врача. 2014; 3 (3): 4–7. [Yakovlev S.V. Ostorozhno, azitromitsin! Vestnik Prakticheskogo Vracha. 2014; 3 (3): 4–7. (in Russian)]
- Козлов Р.С., Суторукова М.В., Сидоренко С.В. и соавт. Чувствительность основных возбудителей бактериальных инфекций к цефторолину в Российской Федерации. Клин микробiol антимикроб химиотер. 2015; 17 (3): 217–226. [Kozlov R.S., Sukhorukova M.V., Sidorenko S.V. i soavt. Chuvstviteľ'nost' osnovnykh vozбудitelej bakterial'nykh infektsij k tseftarolinu v Rossiijskoj Federatsii. Klin Mikrobiol Antimikrob Khimioter. 2015; 17 (3): 217–226. (in Russian)]
- Калиногорская О.С., Беланов С.С., Волкова М.О., Гостев В.В., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность и серотиповый состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей в Санкт-Петербурге в 2010–2013 гг. Антибиотики и химиотер. 2015; 60 (1–2): 10–18. [Kalinogorskaya O.S., Belanov S.S., Volkova M.O., Gostev V.V., Sidorenko S.V. Antibiotikorrezistentnost' i serotipovyy sostav *Streptococcus pneumoniae*, vydelenyykh u detej v Sankt-Peterburge v 2010–2013 gg. Antibiotiki i Khimioter. 2015; 60 (1–2): 10–18. (in Russian)]
- Orfila J., Haider F., Thomas D. Activity of spiramycin against chlamydia, *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother.* 1988 Jul; 22 Suppl B: 73–76. doi: 10.1093/jac/22.supplement_b.73.
- Webster C., Ghazanfar K., Slack R. Sub-inhibitory and post-antibiotic effects of spiramycin and erythromycin on *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1988 Jul; 22 Suppl B: 33–39. doi: 10.1093/jac/22.supplement_b.33.
- Desnottes J.F., Diallo N., Moret G. Effect of spiramycin on adhesiveness and phagocytosis of gram-positive cocci. *J Antimicrob Chemother.* 1988 Jul; 22 Suppl B: 25–32. doi: 10.1093/jac/22.supplement_b.25.
- Pocidalo J.J., Albert F., Desnottes J.F., Kernbaum S. Intraphagocytic penetration of macrolides: *in-vivo* comparison of erythromycin and spiramycin. *J Antimicrob Chemother.* 1985 Jul; 16 Suppl A: 167–173. doi: 10.1093/jac/16.suppl_a.167.
- Kang J.K., Kang H.K., Hyun C.G. Anti-Inflammatory Effects of Spiramycin in LPS-Activated RAW 264.7 Macrophages. *Molecules.* 2022 May 17; 27 (10): 3202. doi: 10.3390/molecules27103202.
- Frydman A.M., Le Roux Y., Desnottes J.F., Kaplan P., Djebbar F., Cournot A., Duchier J., Gaillot J. Pharmacokinetics of spiramycin in man. *J Antimicrob Chemother.* 1988 Jul; 22 Suppl B: 93–103. doi: 10.1093/jac/22.supplement_b.93.
- Brook I. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of spiramycin and their clinical significance. *Clin Pharmacokinet.* 1998 Apr; 34 (4): 303–310. doi: 10.2165/00003088-19983404-00003.
- Osorno T., Umezawa H. Pharmacokinetics of macrolides, lincosamides and streptogramins. *J Antimicrob Chemother.* 1985; 16: Suppl A: 151–166.
- Bergogne-Berezin E., Hamilton-Miller J.M.T. Overview of spiramycin in respiratory tract infections. *Drug Invest.* 1993; 6: Suppl 1: 52–54.
- Carbon C. Clinical efficacy and place of spiramycin in the treatment of acute respiratory tract infections. *Drug Invest.* 1993; 6: Suppl 1: 35–42.
- Montoya J.G., Laessig K., Fazeli M.S., Siliman G., Yoon S.S., Drake-Shanahan E., Zhu C., Akbary A., McLeod R. A fresh look at the role of spiramycin in preventing a neglected disease: meta-analyses of observational studies. *Eur J Med Res.* 2021 Dec 11; 26 (1): 143. doi: 10.1186/s40001-021-00606-7.
- Dunay I.R., Gajurel K., Dhalak R., Liesenfeld O., Montoya J.G. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Sep 12; 31 (4): e00057–17. doi: 10.1128/CMR.00057-17.
- Poulet P.P., Duffaut D., Barthet P., Brumpt I. Concentrations and in vivo antibacterial activity of spiramycin and metronidazole in patients with periodontitis treated with high-dose metronidazole and the spiramycin/metronidazole combination. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Mar; 55 (3): 347–351. doi: 10.1093/jac/dki013.
- Гельцер Б.И., Рубашек И.А., Семисотова Е.Ф., Крамар А.В. Макролидный антибиотик ровамицин при лечении пневмонии. *Тер. архив.* 1996; 68 (12): 22–25. [Gel'tser B.I., Rubashek I.A., Semisotova E.F., Kramar A.V. Makrolidnyj antibiotik rovamitsin pri lechenii pnevmonii. Ter. Arkhiv. 1996; 68 (12): 22–25. (in Russian)]
- Крюков А.И., Полякова Г.С., Огородников Д.С., Гайворонская Г.А. Применение ровамицина и амоксициллана у пациентов с инфекционной патологией ЛОР-органов. *Вестник оториноларингологии.* 1996; 2: 42–45. [Krjukov A.I., Polyakova G.S., Ogorodnikov D.S., Gajvoronskaya G.A. Primenenie rovamitsina i amoksiçlava u patsientov s infekcionnoj patologijei LOR-organov. Vestnik Otorinolaringologii. 1996; 2: 42–45. (in Russian)]
- Ноников В.Е., Макарова О.В., Минаев В.И., Константинова Т.Д. Применение ровамицина при лечении бронхо-легочных инфекций. Клин фармакология и терапия. 1995; 4 (1): 18–21. [Nonikov V.E., Makarova O.V., Minaev V.I., Konstantinova T.D. Primenenie rovamitsina pri lechenii bronkho-legochnykh infektsij. Klin farmakologiya i terapiya. 1995; 4 (1): 18–21. (in Russian)]
- Страчунский Л.С., Судиловская Н.Н., Мелихов О.Г. Ровамицин (спирамицин) — макролидный антибиотик для внутривенного введения: опыт лечения пневмонии. *Тер. архив.* 1995; 67 (3): 7–11. [Strachunskij L.S., Sudilovskaya N.N., Melikhov O.G. Rovamitsin (spiramitsin) — makrolidnyj antibiotik dlya vnutrivennogo vvedeniya: opyt lecheniya pnevmonii. Ter. arkhiv. 1995; 67 (3): 7–11. (in Russian)]
- Суторова М.П., Яковлев С.В., Шахова Т.В., Дворецкий Л.И. Программа эмпирической антибактериальной терапии внебольничной пневмонии. Антибиотики и химиотер. 1998; 43 (7): 31–35. [Suvorova M.P., Yakovlev S.V., Shahova T.V., Dvoretskij L.I. Programma empiricheskoy antibakterial'noj terapii vnebol' nichnoj pnevmonii. Antibiotiki i Khimioter. 1998; 43 (7): 31–35. (in Russian)]

Информация об авторах

Яковлев Сергей Владимирович — д. м. н., профессор кафедры госпитальной терапии №2 Института клинической медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), врач-клинический фармаколог ГКБ им. С. С. Юдина ДЗМ, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7606-8608

Суторова Маргарита Петровна — к. м. н., доцент кафедры госпитальной терапии №2 Института клинической медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), врач-клинический фармаколог ГКБ им. С. С. Юдина ДЗМ, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1389-6454

About the authors

Sergey V. Yakovlev — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Hospital Therapy No. 2 of the Institute of Clinical Medicine of the I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of Health of the Russian Federation, clinical pharmacologist at City Clinical Hospital named after S.S.Yudin, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7606-8608

Margarita P. Suvorova — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Hospital Therapy No. 2 of the Institute of Clinical Medicine of the I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of Health of the Russian Federation, clinical pharmacologist at City Clinical Hospital named after S.S.Yudin, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1389-6454

Оптимизация затрат на лекарственные препараты с использованием систем поддержки принятия решений на основе принципов доказательной медицины

*А. В. КРЮКОВ¹, А. А. НОВИКОВ², Б. М. КУПЧИК²,
Е. В. КОРОВИН³, С. В. ЯКОВЛЕВ⁴, Е. В. КУЗНЕЦОВА¹,
Т. Р. КАМЕНЕВА¹, Е. Д. ЛАРЮШКИНА¹, М. В. ЖУРАВЛЕВА⁴

¹ ГБУ г. Москвы «НИИ организации здравоохранения и медицинского менеджмента ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

² ООО «ФармФрейм», Москва, Россия

³ АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении», Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)», Москва, Россия

Drug Cost Optimization Using Evidence-Based Decision Support Systems

*ALEXANDER V. KRYUKOV¹, ANTON A. NOVIKOV², BORIS M. KUPCHIK²,
EVGENIY V. KOROVIN³, SERGEY V. YAKOVLEV⁴, ELENA V. KUZNETSOVA¹,
TATIANA R. KAMENEVA¹, ELENA D. LARYUSHKINA¹, MARINA V. ZHURAVLEVA⁴

¹ Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

² PharmFrame LLC, Moscow, Russia

³ Moscow Center of Innovative Technologies in Healthcare, Moscow, Russia

⁴ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Резюме

Представлен обзор специализированных медицинских информационных систем, выполняющих ABC/VEN-анализ. Дано сравнение конкретных примеров, описаны их преимущества и недостатки, возможности автоматизации процессов поиска информации о наличии доказанной эффективности лекарственных препаратов (ЛП), подбора альтернативных ЛП в рамках одной АТХ-группы, подбора альтернативных ЛП в рамках действующих клинических рекомендаций МЗ РФ, оценки межлекарственных взаимодействий, а также наличие справочной информации из инструкции по применению ЛП.

Ключевые слова: системы поддержки принятия решений, ABC-анализ, VEN-анализ, фармакоэкономика, автоматизированный анализ

Для цитирования: Крюков А. В., Новиков А. А., Купчик Б. М., Коровин Е. В., Яковлев С. В., Кузнецова Е. В., Каменева Т. Р., Ларюшкина Е. Д., Журавлева М. В. Оптимизация затрат на лекарственные препараты с использованием систем поддержки принятия решений на основе принципов доказательной медицины. Антибиотики и химиотер. 2023; 68: 7–8: 90–98. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-90-98>.

Abstract

The article presents an overview of specialized medical information systems that perform ABC/VEN analysis. It provides a comparison of specific examples, describes their advantages and disadvantages, as well as the possibility of automating the processes of searching for information on the proven effectiveness of drugs, selecting alternative drugs within one ATC group, selecting alternative drugs within the framework of the current clinical recommendations of the Ministry of Health of the Russian Federation, assessing drug-drug interactions, as well as the reference information from the instructions for use of the drugs.

Keywords: decision support systems, ABC analysis, VEN analysis, pharmacoconomics, automated analysis

For citation: Kryukov A. V., Novikov A. A., Kupchik B. M., Korovin E. V., Yakovlev S. V., Kuznetsova E. V., Kameneva T. R., Laryushkina E. D., Zhuravleva M. V. Drug cost optimization using evidence-based decision support systems. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2023; 68: 7–8: 90–98. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-90-98>.

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Шарикоподшипниковская, д. 40, НИИОЗММ, г. Москва, Россия, 115088.
E-mail: alex.kryukov90@yandex.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 40 Sharikopodshipnikovskaya st., Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management, Moscow, 115088 Russia.
E-mail: alex.kryukov90@yandex.ru

Введение

Согласно указу Президента РФ от 06.06.2019 г. №254 «О стратегии развития здравоохранения в Российской Федерации на период до 2025 г.», одной из основных задач развития здравоохранения в Российской Федерации является повышение доступности и качества медицинской помощи.

На государственном уровне признаны важнейшими развитие и внедрение инновационных методов диагностики, профилактики и лечения, а также основ персонализированной медицины; совершенствование процессов организации медицинской помощи на основе внедрения информационных технологий [1].

Среди приоритетных направлений, по которым должно осуществляться решение основных задач, выделено дальнейшее внедрение информационно-аналитической системы мониторинга и контроля в сфере закупок лекарственных препаратов (ЛП) для обеспечения государственных и муниципальных нужд [2].

Цель работы — представить обзор современных инструментов автоматизированного анализа структуры затрат на ЛП и их возможности в качестве систем поддержки принятия решений на основе принципов доказательной медицины.

Подходы к анализу распределения лекарственных препаратов по степени затратности и жизненной необходимости

На эффективность и безопасность медикаментозного лечения оказывает влияние ряд факторов. Со стороны системы здравоохранения одним из таких факторов является практика назначения ЛП с низким уровнем доказательств клинической эффективности [3]. Так, результаты проведённого VEN-анализа закупаемых ЛП в Дальневосточном регионе показали, что в группу препаратов с недоказанной эффективностью вошло 29% ЛП, что составило 3% от общих затрат на ЛП [4]. В настоящее время проблема оценки технологий здравоохранения, в том числе лекарственной терапии, является одной из важнейших в современной медицине [5].

Помимо анализа затрат важнейшим этапом такой оценки является поиск достоверной информации об эффективности и безопасности медицинской технологии [6]. Применение в клинической практике ЛП с недостаточными доказательствами эффективности может снижать качество оказываемой медицинской помощи. Одним из ярких примеров широкого использования в клинической практике ЛП с низким уровнем до-

казательной базы служит применение ноотропных препаратов. Так, по результатам обзора исследований сравнения стандартной терапии и стандартной терапии с добавлением ноотропных препаратов при ишемическом инсульте, проведённого Коクリэн, сделаны выводы, что добавление ноотропов не влияет на риск смерти после инсульта в сравнении с группой, получавшей стандартную терапию, но приводит к увеличению количества нежелательных реакций (НР) [7].

Анализ структуры затрат на ЛП является одним из основных мероприятий по оптимизации потребления и расходов на фармакотерапию [8].

Тщательный мониторинг рациональности закупок, количества и качества используемых для терапии ЛП, целесообразность их назначений, лекарственных взаимодействий и развития НР, проведение ABC/VEN- и DDD-анализа, которые включены в функциональные обязанности врачей-клинических фармакологов, направлены на повышение качества и безопасности лекарственной терапии [9].

ABC/VEN-анализ на сегодняшний день является наиболее известным инструментом, позволяющим дать оценку эффективности использования материальных и финансовых ресурсов [10].

Он рекомендован к применению Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и используется в практике здравоохранения во всём мире с 1981 г. ABC/VEN-анализ представляет собой простой и эффективный метод анализа расходов на лекарства, выявляющий приоритетные группы лекарств, использование которых может обеспечить наибольший клинический и экономический эффект.

ABC-анализ, как метод оценки структуры расходов, представляет собой распределение ЛП по трём классам (A, B и C) в зависимости от объёмов их потребления на протяжении какого-либо определённого периода. Затраты определяются как произведение стоимости единицы/упаковки препарата на количество закупленных единиц/упаковок. ABC-анализ позволяет рассмотреть потребление ЛП в стоимостном выражении, свести к минимуму необоснованные затраты и устраниить потенциальные проблемы с доступностью ЛП по причине нерационального расходования средств [11].

ЛП распределяются на группы в зависимости от затрат, где группа A — это ЛП, составляющие 80% затрат; группа B — 15%; группа C — 5% [12, 13]. ABC-анализ позволяет получить точную и объективную картину расходов на ЛП.

VEN-анализ позволяет оценить клиническую значимость ЛП при их выборе для закупки и использования в системе здравоохранения. VEN-анализ осуществляется экспертами путём распределения ЛП на группы: V (Vital, жизненно необходимые) — ЛП потенциально спасающие

жизни или имеющие решающее значение для оказания медицинской помощи; E (Essential, необходимые) — ЛП, эффективны при значимых заболеваниях, но не являются абсолютно необходимыми для оказания базовой медицинской помощи; N (Non-essential, второстепенные) — ЛП с сомнительной эффективностью или с симптоматическими показаниями, которые не требуют назначения фармакотерапии [10, 11, 14].

Подходы к проведению VEN-анализа

Для проведения VEN-анализа необходимо получить информацию о профиле оказываемой медицинской помощи, ведущих нозологических формах и сопутствующих заболеваниях у пациентов на уровне отдельной медицинской организации или на региональном уровне [15]. Существуют несколько подходов к проведению VEN-анализа: экспертный — оценка значимости с позиции конкретного заболевания, и формальный — проверка на соответствие нормативным документам — утверждённым перечням ЛП. В случае экспертного подхода в идеале происходит реализация принципов доказательной медицины: критериями, позволяющими отнести лекарственный препарат к группе V, являются результаты качественных клинических исследований. Если при определённой патологии показания к назначению ЛП с доказанной эффективностью относительные, то его относят к группе E. К группе N ЛП относят в том случае, если он противопоказан либо доказательства его эффективности отсутствуют [15].

Предпринимаются попытки стандартизировать процесс присвоения категорий VEN [16]. В работе А. В. Шульмина и др. [16] был создан алгоритм, повышающий формализацию процесса распределения по категориям VEN. Присвоение той или иной категории происходит по количеству баллов с учётом существующих для данного ЛП доказательств эффективности. Стоит отметить, что такая работа сопряжена со значительными финансовыми и временными затратами на проведение анализа экспертами.

Реализация принципов доказательной медицины при определении категорий VEN

Доказательная медицина — это междисциплинарный подход использующий наилучшие научные данные с целью принятия оптимальных клинических решений с учётом индивидуального опыта врача и ценности для пациента [17, 18]. К оценке достоверности доказательств эффектив-

ности медицинских технологий и убедительности рекомендаций необходим формализованный систематизированный подход для предотвращения ошибок в суждениях экспертов, сохранения критического восприятия и распространения среди специалистов в области здравоохранения [19, 20]. Однако в настоящий момент не существует единой, всеми принятой системы для оценки методологического качества исследований.

Системы доказательств (GRADE и др.)

Имеются различные шкалы для оценки убедительности доказательств и уровней достоверности доказательств в клинических рекомендациях. Они основаны на одинаковых принципах и различаются по степени детализации. К примерам таких шкал относятся:

- Уровни доказательности данных [21].
- Классы доказательств в клинических рекомендациях [22].
- Уровни доказательств для исследований в области терапии/профилактики [23].
- Градации доказательств в рекомендациях [23].

К методам оценки уровня достоверности доказательств и рекомендаций в сфере здравоохранения также относятся: подход GRADE — система классификации, оценки, разработки и экспертизы рекомендаций [16, 20, 24], подходы SIGN (Scottish Intercollegiate Guidelines Network), OCEBM (Oxford Center For Evidence-Based Medicine), NICE (National Institute For Health And Clinical Excellence) и NHMRC (National Health And Medical Research Council) [20].

Большое количество применяемых методик делает процесс оценки медицинских технологий непрозрачным и повышает риск ошибки на этапе формирования клинических рекомендаций и при последующем принятии решений медицинскими работниками и организаторами здравоохранения [25]. Ещё одним недостатком использования данных шкал являются временные затраты экспертов.

Системы поддержки принятия решений

В условиях накопления огромных массивов медицинских данных и постоянного обновления актуальных клинических рекомендаций на первый план выходит способность эффективного применения наилучших подходов с высоким уровнем доказательности. В современном здравоохранении помощниками в поиске и применении наилучших практик становятся различного рода системы поддержки принятия решений.

Системы поддержки принятия решений (СППР) — класс специализированных медицинских информационных систем, зарегистрированных в установленном порядке для медицинского применения и являющихся частью медицинских информационных систем для локального использования в медицинских организациях [3].

В отсутствие системных изменений необходимы инновации для сокращения затрат на лекарства. По этой причине, создание и введение в практику СППР — на сегодняшний день является наиболее востребованной областью различных отраслей современной медицины, способствующей оптимизации временных и финансовых ресурсов, а также улучшению качества медицинской помощи [26, 27].

На настоящий момент существует ряд информационных продуктов, оснащённых специализированным функционалом, направленным на фармацеекономическую аналитику закупаемых ЛП, анализ межлекарственных взаимодействий, помочь в составлении годовых отчётов консультаций врача-клинического фармаколога, а также на возможность персонализированного назначения ЛП с учётом фармакогенетического тестирования.

По способу взаимодействия с МИС СППР подразделяют на системы, интегрированные в МИС, и системы, существующие в форме автономной программы [28, 29].

Примеры отечественных СППР для проведения анализа степени затратности и жизненной необходимости лекарственных препаратов PharmSuitePro [30, 31]

PharmSuitePro, разработанный на базе Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии (г. Челябинск), представляет собой бесплатный сервис в формате «автоматизированное рабочее место клинического фармаколога». Одним из основных является модуль ABC-анализа. Проведение анализа возможно с использованием как международных непатентованных (МНН), так и торговых наименований, а также с учётом формы выпуска ЛП. Также реализован ABC-анализ по ATX группам, что позволяет проводить оценку в разрезе разных уровней ATX-классификации. В программе представлены модули по оценке лекарственных взаимодействий с учётом критериев Бирса, фармакогенетике отдельных групп ЛП и модуль для заполнения протокола консультации врача-клинического фармаколога.

Среди недостатков — отсутствие возможности автоматического определения группы VEN с учётом доказательной базы ЛП, анализ выполняется пользователем вручную.

Программный комплекс «Medical Economic Control» — ПК «МЕС» [13]

Кубанским государственным университетом разработана автономная программа с целью анализа структуры льготного потребления ЛП путём оценки рациональности расходования бюджета в условиях Федерального проекта обеспечения необходимыми лекарственными препаратами (ОНЛП). Программа предназначена для управления процессами планирования и контроля за назначением и обеспечением медикаментами отдельных льготных категорий граждан на территории Краснодарского края.

Модуль ABC-анализа реализован как автономное приложение и может использоваться только в рамках данного программного комплекса.

Охват исключительно льготных категорий граждан, отсутствие возможности для проведения VEN-анализа, а также достаточно сложный для восприятия интерфейс делает применение программы ограниченным узкой аудиторией пользователей.

Фармкомпайл [32]

Продукт «Фармкомпайл» от компании «Софт-медицика» разработан в качестве автоматизированного помощника для проведения ABC/VEN-анализа на разных уровнях медицинской организации. Программа предлагает поэтапное проведение ABC- и VEN-анализа загруженного в систему перечня ЛП. Выгрузка результатов происходит в форме отчёта, графических материалов (таблицы, диаграммы) либо в формате специально созданного файла.

Одним из ключевых недостатков является низкая степень автоматизации процессов, что ведёт к увеличению временных затрат. VEN-анализ возможен только в ручном режиме.

«Электронный клинический фармаколог» [33]

Продукт от компании «Софт-медицика» представлен в виде нескольких модулей с возможностью интеграции ПО в МИС. Модуль «Аналитические инструменты» предлагает автоматизированное проведение ABC/VEN-анализа, результаты которого можно получить в виде файлов Word, Excel или PowerPoint. Полученные данные могут быть использованы на уровне медицинских организаций с целью принятия решения о включении ЛП в формулярный перечень больницы.

К недостаткам ПО можно отнести отсутствие возможности автоматизированного распределения ЛП по группам VEN с учётом доказанной эффективности.

PharmFrame

В основу данной системы поддержки принятия решений заложены методология и принципы доказательной медицины. Синтезированные алгоритмы и программное обеспечение PharmFrame производят автоматический анализ широкого перечня международных баз биомедицинских исследований с отбором публикаций высшего уровня доказательности: рандомизированных клинических исследований, метаанализов, систематических обзоров, подтверждающих наличие доказательной базы для ЛП, зарегистрированных в РФ. Результаты анализа визуализируются в специально разработанном интерфейсе PharmFrame. Система запатентована [10], программное обеспечение (ПО) внесено в реестр российского ПО [16].

Основным преимуществом PharmFrame является возможность оптимизации закупок ЛП на основе принципов доказательной медицины. PharmFrame включает несколько дополняющих друг друга модулей анализа ЛП:

1. ABC/VEN-анализ с применением запатентованной системы скоринга ЛП.

2. Альтернативные ЛП по международной ATX-классификации.

3. Альтернативные ЛП в рамках национальных клинических рекомендаций.

4. Оценка статуса ЛП в международных клинических рекомендациях (рекомендован/не рекомендован).

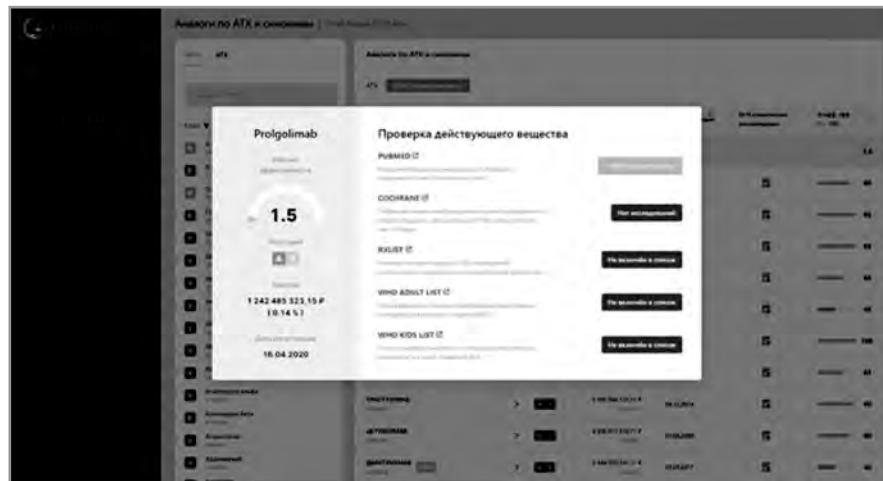
5. Оценка лекарственных взаимодействий.

После загрузки в систему данных о перечне закупаемых ЛП автоматически формируется отчёт по итогам ABC/VEN-анализа с оценкой структуры затрат (рис. 1).

Программа позволяет осуществлять поиск конкретного действующего вещества среди списка всех ЛП, определять категорию А, В, С, В, Е и N и формировать отчёт о доле анализируемого препарата в общем объёме закупок пользователя (модуль 1). Сервис позволяет ранжировать ЛП в зависимости от степени их изученности в исследованиях с наивысшим уровнем доказательности. Пользователь имеет доступ к обоснованию при-



Рис. 1. ABC/VEN-анализ.
Fig. 1. ABC/VEN-analysis.



**Рис. 2. Карточка препарата.
Fig. 2. Drug card.**

свойной категории V, E или N в разделе «карточка препарата» (рис. 2) с ссылками на анализируемые источники информации о ЛП (базы данных PubMed, Cochrane, Rxlist, Примерный перечень основных лекарственных средств ВОЗ). Таким образом, система предоставляет оперативный доступ к информационной поддержке решений при перераспределении средств бюджета в пользу ЛП, имеющих лучшую доказательную базу.

Сервис позволяет не только проводить быструю оценку имеющихся доказательств эффективности, но и выполнять поиск альтернативных ЛП, применяющихся по аналогичным показаниям.

Автоматизированный подбор альтернатив возможен как внутри одной фармакологической группы по международной ATX-классификации, так и среди ЛП, включённых в национальные клинические рекомендации по конкретной нозологии (рис 3). Пользователю доступен список всех российских клинических рекомендаций, в которые входит анализируемый ЛП.



Рис. 3. Подбор альтернативных ЛП.
Fig. 3. Selection of alternative drugs.

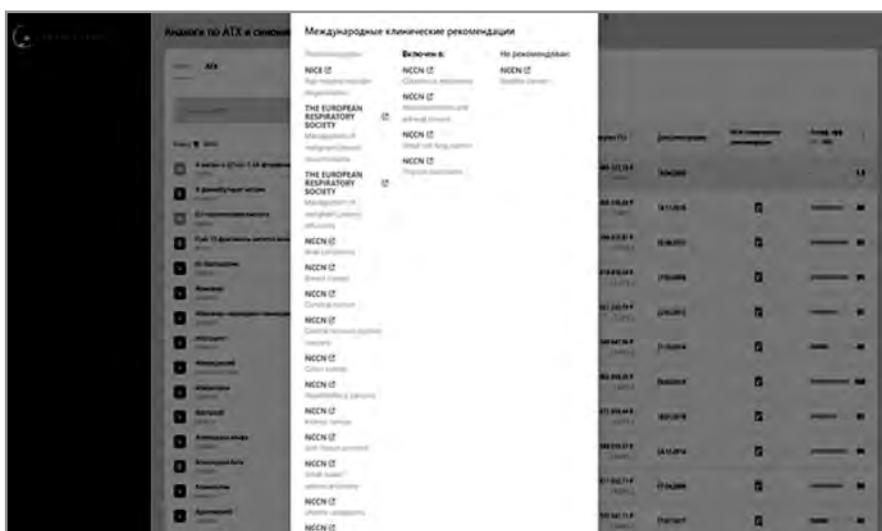


Рис. 4. Оценка статуса ЛП в международных клинических рекомендациях.
Fig. 4. Assessment of drug's status in international clinical guidelines.



Рис. 5. Оценка лекарственных взаимодействий.
Fig. 5. Evaluation of drug interactions.

В системе также реализован модуль оценки статуса анализируемого ЛП в международных клинических рекомендациях (рис. 4). В рамках данного раздела пользователю доступен список международных клинических рекомендаций, в которые включён ЛП, с ссылками на соответствующие официальные источники рекомендаций. Это позволяет пользователю принимать решение о закупке и применении ЛП, базируясь также на международном опыте.

Клинический компонент поддержки принятия решений включает модуль оценки лекарственных взаимодействий с описанием потенциальных рисков разного уровня значимости при одновременном назначении отдельных пар ЛП (рис. 5).

В рамках консультирования по вопросам фармакотерапии это позволяет подбирать ЛП с меньшей вероятностью возникновения НР, связанных с лекарственными взаимодействиями.

Таким образом, потенциальными практическими результатами применения системы PharmFrame являются:

— оптимизация закупочной деятельности в области лекарственного обеспечения за счёт рационального расходования средств с учётом современных данных об уровне доказательной базы ЛП;

— отказ или снижение объёма закупок ЛП с низким уровнем доказанной эффективности, а также переход на более экономически выгодные аналоги препаратов (не уступающие по уровню эффективности). Ожидаемая экономия бюджета, по оценкам разработчиков сервиса, от 5 до 13%;

— снижение нагрузки на специалистов, отвечающих за формирование лекарственных перечней и проведение закупок ЛП в ме-

	PharmSuitePro	«Medical Economic Control» – ПК «МЕС»	Софтмедика	PharmFrame	«Электронный клинический фармаколог»
ABC-анализ	+	+	+	+	+
VEN-анализ	Ручной	—	Ручной	Автоматизированный	Ручной
Анализ доказательной базы эффективности ЛП	—	—	—	—	—
Наличие справочной информации из инструкции по применению ЛП	—	—	—	—	+
Модуль лекарственных взаимодействий	+	—	—	+	—
Возможность подбора альтернативных ЛП в рамках одной АТХ-группы	—	—	—	—	—
Возможность подбора альтернативных ЛП в рамках действующих клинических рекомендаций МЗ РФ	—	—	—	—	—
Модуль поддержки принятия решений на основе фармакогенетического тестирования	+	—	—	—	—

дицинских организациях и региональных органах управления здравоохранением за счёт автоматизации процесса обработки и анализа медицинской информации;

— своевременное формирование плана закупок, что позволяет избежать рисков количественного дефицита ЛП в медицинской организации.

Заключение

Внедрение информационных технологий в клиническую практику является одной из приоритетных задач российского здравоохранения, признанных на государственном уровне.

В настоящее время в РФ существуют несколько вариантов программного обеспечения, созданных в формате систем поддержки принятия решений, которые также позволяют выполнять ABC-анализ.

По результатам сравнительного анализа характеристик наиболее широким функционалом на настоящий момент обладает сервис PharmFrame (таблица).

Такие возможности как автоматизированный поиск информации о наличии доказанной эффективности ЛП с проведением VEN-анализа, модули поиска альтернативных ЛП внутри АТХ-групп, а также внутри действующих в РФ клинических рекомендаций реализованы только в данной системе.

Наличие подобных технических характеристик позволяет в рамках одного программного продукта проводить широкую аналитическую работу по лекарственной терапии с принятием как экономических (перераспределение бюджета, отказ от закупок ЛП с низкой доказательной базой), так и клинических решений (оценка рисков фармакотерапии у конкретного пациента, поиск альтернативных ЛП как внутри одной фармакологической группы, так и среди ЛП с иным механизмом действия).

В конечном итоге внедрение СППР в работу медицинских информационных систем повысит качество и безопасность проводимой фармакотерапии и позволит достичь положительного экономического эффекта для медицинской организации и регионального здравоохранения в целом.

Дополнительная информация

Вклад авторов. А. В. Крюков — идея и разработка концепции рукописи, систематизация данных литературы, написание и редактирование текста рукописи, формулировка выводов, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; А. А. Новиков — редактирование текста рукописи, обобщение результатов, доработка рукописи; Б. М. Купчик — критический пересмотр содержания и результатов рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; Е. В. Коровин — доработка и редактирование текста рукописи, формулировка выводов; С. В. Яковлев — идея и разработка концепции рукописи; Е. В. Кузнецова — редактирование текста рукописи; Т. Р. Каменева — обобщение результатов, доработка рукописи; Е. Д. Ларюшкина — доработка рукописи; М. В. Журавлева — идея и разработка концепции рукописи.

Благодарности. Данная работа выполнена при финансовой поддержке АНО Московский центр инновационных технологий в здравоохранении (МЦИТЗ).

Конфликт интересов. Новиков А. А., Купчик Б. М. являются представителями ООО «Фарм-Фрейм» и разработчиками системы PharmFrame.

Литература/References

- Государственная программа РФ «Развитие здравоохранения», [Электронный ресурс]. URL: <http://government.ru/rugovclassifier/855/events/>. [Gosudarstvennaya programma RF «Razvitiye zdorovokhraneniya», [Elektronnyj resurs]. URL: <http://government.ru/rugovclassifier/855/events/>. (in Russian)]
- Указ Президента РФ от 06.06.2019 г. №254 «О стратегии развития здравоохранения в Российской Федерации на период до 2025 года», [Электронный ресурс]. [Ukaz Prezidenta RF of 06.06.2019 g. №254 «O strategii razvitiya zdorovokhraneniya v Rossiskoj Federatsii na period do 2025 goda», [Elektronnyj resurs]. (in Russian)]
- Лебедев Г.С., Фартушный Э.Н., Шадеркин И.А., Клименко Г.С., Рябков И.В., Кожин П.Б. и др. Создание информационной системы поддержки принятия врачебных решений на основе методов доказательной медицины. Российский журнал телемедицины и электронного здравоохранения. 2019; 1–2: 8–16. doi: <https://doi.org/10.29188/2542-2413-2019-5-1-8-16>. [Lebedev G.S., Fartushny E.N., Shadernik I.A., Klimenko G.S., Ryabkov I.V., Kozhin P.B. et al. Bilding of the medical decision support system on the basis of providing medicine based on evidence-based medicine. Rossijskij Zhurnal Telemeditsiny i Elektronnogo Zdravookhraneniya. 2019; 1–2: 8–16. doi: <https://doi.org/10.29188/2542-2413-2019-5-1-8-16>. (in Russian)]
- Казакова Е.В. Мониторинг назначения и оптимизация использования лекарственных средств при реализации программ государственных гарантий (на примере Дальневосточного федерального округа): дисс. ... д-ра. мед. наук. Х.: 2020. [Kazakova E.V. Monitoring naznacheniya i optimizatsiya ispol'zovaniya lekarstvennykh sredstv pri realizatsii programm gosudarstvennykh garantij (na primere Dal'nevostochnogo federal'nogo okruga): diss. ... d-ra. med. nauk. Kh.: 2020. (in Russian)]
- Авксентьева М.В., Омельяновский В.В. Перспективы оценки технологий в здравоохранении Российской Федерации. Доктор.Ру. Терапия. Заболевания органов дыхания. Клиническая медицина сна. 2015; 3 (104) — 4 (105): 12–16. [Avkseyeva M.V., Omelyanovsky V.V. Perspectives of health technology assessment in the Russian Federation. Doctor.Ru. Internal Medicine. Clinical Sleep Medicine2015; 3 (104) — 4 (105): 12–16. (in Russian)]
- ГОСТ Р 56044–2014. Оценка медицинских технологий. Общие положения. М.: Стандартинформ, 2014; 111. [GOST R 56044–2014. Otsenka meditsinskikh tekhnologij. Obshchie polozheniya. M.: Standardinform, 2014; 111. (in Russian)]
- https://www.cochrane.org/ru/CD007026/STROKE_cerebrolin-pri-ostrom-ishemicheskem-insulte
- Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 57525–2017 «Клинико-экономические исследования. Общие требования». [Natsional'nyj standart RF GOST R 57525–2017 «Kliniko-ekonomicheskie issledovaniya. Obshchie trebovaniya»]. (in Russian)]
- Габбасова Л.А., Шаповалова Ю.С. Роль АТС/DDD — методологии в оптимизации практики применения антибактериальных препаратов в условиях многопрофильного лечебно-профилактического учреждения. Качественная Клиническая Практика. 2008; 2: 39–46. [Gabbasova L.A., Shapovalova Y.S. The role of the ATC/DDD methodology in optimizing the practice of using antibacterial drugs in a multidisciplinary medical and preventive institution. Kachestvennaya Klinicheskaya Praktika = Good Clinical Practice. 2008; 2: 39–46. (in Russian)]
- Малаев М.Г. Анализ эффективности использования финансовых средств при закупках лекарственных препаратов для государственных нужд. Качественная Клиническая Практика. 2021; 4: 75–79. <https://doi.org/10.37489/2588-0519-2021-4-75-79>. [Malaev M.G. Analysis of the effectiveness of the use of financial resources in the procurement of pharmaceuticals for state needs. Kachestvennaya Klinicheskaya Praktika = Good Clinical Practice. 2021; 4: 75–79. <https://doi.org/10.37489/2588-0519-2021-4-75-79>. (in Russian)]
- World Health Organization. (2003). Drug and therapeutics committees: a practical guide. authors: Kathleen Holloway (ed.), Terry Green.
- Лобан Д.С., Кругликова А.В. ABC/VEN-анализ потребления лекарственных средств в учреждении «Гомельский областной клинический кожно-венерологический диспансер» на период перепрофилирования для лечения инфекции COVID-19. Молодежный инновационный вестник. 2022; 11: 230–232. [Loban D.S., Kruglikova A.V. ABC/VEN-analysis of drug consumption for the period of conversion for the treatment of COVID-19 infection. Molodezhny Innovatsionny Vestnik. 2022; 11: 230–232. (in Russian)]
- Халафян А.А., Кошкаров А.А., Фабрицкая Е.Ю. Система поддержки принятия решений на основе ABC/VEN-анализа льготного потребления лекарственных препаратов. Фундаментальные исследования. 2016; 4–2: 323–327. [Khalafyan A.A., Koshkarov A.A., Fabritskaya E.Yu. Decision support system based on ABC/VEN-analysis of preferential drugs consumption. Fundamental Research. 2016; 4–2: 323–327. (in Russian)]
- Yevstigneev S.V., Titarenko A.E., Abakumova T.R., Alexandrova E.G., Khasiazkhmetova V.N., Ziganshina L.E. Towards the rational use of medicines. Int J Risk Saf Med. 2015; 27 Suppl 1: S59–S60. doi: 10.3233/JRS150690.
- Жиличевич Л.А., Мигаль Т.Ф., Адаменко Е.И., Гавриленко Л.Н., Кожанова И.Н., Романова И.С. Применение фармакоэкономических и фармакоэпидемиологических методов при разработке лекарственного формулляра государственной организации здравоохранения. Инструкция по применению. 2010. [Zhilevich L.A., Migal' T.F., Adamenko E.I., Gavrilenko L.N., Kozhanova I.N., Romanova I.S. Primenenie farmakoekonomicheskikh i farmakoepidemiologicheskikh metodov pri razrabotke lekarstvennogo formulyara gosudarstvennoj organizatsii zdorovookhraneniya. Instruktsiya po primeneniyu. 2010. (in Russian)]
- Шульмин А.В., Лескова Н.Ю., Акуленок А.В., Солкин А.А., Конорев М.Р., Шевцова В.В. Алгоритмы принятия управленческих решений на основе экспертного VEN-анализа. Вестник фармации. 2021; 4 (94): 25–31. <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2021.4.25>. [Shulmin A.V., Leskova N.Y., Akulenok A.V., Solkin A.A., Konorev M.R., Shevtsova V.V. Management decision-making algorithms based on expert ven-analysis. Vestnik Farmatsii. 2021 № 4 (94): 25–31. <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2021.4.25>. (in Russian)]
- Shah H.M., Chung K.C. Archie Cochrane and his vision for evidence-based medicine. Plast Reconstr Surg. 2009 Sep; 124 (3): 982–988. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181b03928
- Sackett D. L., Rosenberg W. M. C., Gray J. A. M., Haynes R. B., Richardson W. S. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. BMJ. 1996; 312: 71 doi:10.1136/bmj.312.7023.71.
- Андреева Н.С., Реброва О.Ю., Зорин Н.А., Авксентьева М.В., Омельяновский В.В. Системы оценки достоверности научных доказательств и убедительности рекомендаций: сравнительная характеристика и перспективы унификации. Медицинские технологии оценка и выбор. 2012; 4. [Andreeva N.S., Rebrova O.Y., Zorin N.A., Avkseyeva M.V., Omelyanovsky V.V. Systems for assessing the reliability of scientific evidence and the soundness of Guidelines: comparison and prospects for unification. Meditsinskie Tekhnologii Otsenka i Vybor. 2012; 4. (in Russian)]
- GRADE Working Group. Grading quality of evidence and strength of recommendations Bmj. 2004; 328 (7454): 1490.
- Американское агентство по политике здравоохранения и научным исследованиям. <http://www.ahrq.gov/browse/evidmed.htm> [Amerikanskoe agentstvo po politike zdorovookhraneniya i nauchnym issledovaniyam. <http://www.ahrq.gov/browse/evidmed.htm>]
- Шотландская Межколлегиальная медицинская сеть. <http://www.sign.ac.uk> [Shotlandskaya Mezhkollegial'naya meditsinskaya set'. <http://www.sign.ac.uk>]
- Оксфордский центр доказательной медицины. <http://www.cebm.net/index.aspx?o=1025>. [Oksfordskij tsentr dokazatel'noj meditsiny. <http://www.cebm.net/index.aspx?o=1025>]
- Elhelw B. Evidence-based medicine corner-grading the quality of evidence and the strength of recommendations: the Grade approach. Middle East Fertility Society Journal. 2006; 11 (1): 70–72.
- Журавлева Н.И., Шубина Л.С., Сухоруких О.А. Обзор методик оценки достоверности научных доказательств и убедительности рекомендаций, применяемых при разработке клинических рекомендаций в Российской Федерации. Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2019; 12 (1): 34–41. doi: <https://doi.org/10.17749/2070-4909.2019.12.1.34-41>. [Zhuravleva N.I., Shubina L.S., Sukhorukikh O.A. The use of the level of evidence and grade of recommendations scales in developing clinical guidelines in the Russian Federation. Farmakoekonomika. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology. 2019; 12 (1): 34–41. doi: <https://doi.org/10.17749/2070-4909.2019.12.1.34-41>. (in Russian)]
- Serritella A.V., Strohbehn G.W., Goldstein D.A., Lichten A.S., Ratain M.J. Interventional pharmacoeconomics: a novel mechanism for unlocking value. Clin Pharmacol Ther. 2020; 108 (3): 487–93. <https://doi.org/10.1002/cpt.1853>

Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

27. Эриванцева Т.Н., Блохина Ю.В. Искусственный интеллект в здравоохранении. Возможности патентной охраны таких разработок. Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2021; 14 (2): 270–76. doi: <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2021.063>. [Erivantseva T.N., Blokhina Yu.V. Artificial intelligence in healthcare: possibilities of patent protection. Farmakoeconomika. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology. 2021; 14 (2): 270–76. doi: <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoekonomika.2021.063>. (in Russian)]
28. Кочетова Е.А. Роль информационных технологий во внедрении фармакогенетического тестирования в реальную клиническую практику. Фармакогенетика и фармакогеномика. 2016; 1: 29–34. [Kochetova E.A. The role of information technology in the implementation of pharmacogenetic testing in real clinical practice. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. 2016; 1: 29–34. (in Russian)]
29. Bell G.C., Crews K.R., Wilkinson M.R., Haidar C.E., Hicks J.K., Baker D.K. et al. Development and use of active clinical decision support for preemptive pharmacogenomics. J Am Med Inform Assoc. 2014; 21 (e1): e93–99. doi: 10.1136/amiajnl-2013-001993.
30. <http://pharmsuite.ru/web2/>
31. Цветов В.М. PharmSuitePro — автоматизированное рабочее место врача клинического фармаколога. Фармакокинетика и Фармакодинамика. 2016; 1: 54–55. [Tsvetov V.M. PharmSuitePro — the automated workplace of clinical pharmacologist. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. 2016; 1: 54–55. (in Russian)]
32. <http://soft-medica.ru/service/farmcompile>
33. <https://www.ecp.umkb.com/ecp-analytics>

Информация об авторах

Крюков Александр Валерьевич — к. м. н., специалист ОМО по клинической фармакологии ГБУ города Москвы «Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7903-2977

Новиков Антон Александрович — ООО «ФармФрейм», Москва, Россия

Купчик Борис Миронович — ООО «ФармФрейм», Москва, Россия

Коровин Евгений Витальевич — АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении», Москва, Россия

Яковлев Сергей Владимирович — д. м. н., профессор кафедры госпитальной терапии №2 Института клинической медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); врач-клинический фармаколог ГКБ им. С. С. Юдина ДЗМ, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7606-8608

Кузнецова Елена Викторовна — заведующий организационно-методическим отделом по клинической фармакологии ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1262-4430

Каменева Татьяна Рудольфовна — к. м. н., доцент, ведущий специалист организационно-методического отдела по клинической фармакологии ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3957-5015

Ларюшкина Елена Дмитриевна — специалист организационно-методического отдела по клинической фармакологии ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2968-8235

Журавлева Марина Владимировна — д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9198-8661

About the authors

Alexander V. Kryukov — Ph. D. in Medicine, specialist in clinical pharmacology at the Organization and Methodology Department, Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7903-2977

Anton A. Novikov — PharmFrame LLC, Moscow, Russia

Boris M. Kupchik — PharmFrame LLC, Moscow, Russia

Evgeniy V. Korovin — Moscow Center of Innovative Technologies in Healthcare, Moscow, Russia

Sergey V. Yakovlev — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Hospital Therapy No. 2 of the Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); clinical pharmacologist of the State Clinical Hospital named after S. S. Yudin DZM, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7606-8608

Elena V. Kuznetsova — Head of the Organizational and Methodological Department of Clinical Pharmacology, Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1262-4430

Tatiana R. Kameneva — Ph. D. in Medicine, Associate Professor, leading specialist of the Organizational and Methodological Department of Clinical Pharmacology, Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3957-5015

Elena D. Laryushkina — specialist of the Organizational and Methodological Department of Clinical Pharmacology, Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-2968-8235

Marina V. Zhuravleva — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9198-8661

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Редакция обращает внимание авторов на следующие правила и форму представления рукописей для публикации в журнале «Антибиотики и химиотерапия».

1. Статьи направляются по адресу: journalgnca@yandex.ru или размещаются ЧЕРЕЗ САЙТ журнала после регистрации в личном кабинете автора. Рукописи статей в 1 экз. направляются по адресу: **Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия», ул. Нагатинская, д. 3а, 117105**. Рукопись должна иметь сопроводительное письмо, подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа. Статья подписывается всеми авторами **с указанием ответственного за переписку (Ф.И.О., адрес, телефон)**.

2. В выходных данных статьи указываются: название статьи, инициалы, фамилии авторов, наименования учреждений всех авторов.

3. Статья печатается на одной стороне стандартного листа **через 1,5 интервала при ширине полей слева 3 см**.

4. Объём оригинальной статьи (как правило) не должен превышать 12 страниц, включая таблицы и иллюстрации, общее количество иллюстраций — не более 5. Объём обзорной статьи не должен превышать 20 страниц, а список цитируемой литературы — не более 100 названий. Объём заказанных статей устанавливается по договоренности.

5. Оригинальная статья должна включать (по порядку) следующие основные разделы: «Резюме» — не более 1 страницы; «Введение» с кратким обзором литературы и постановкой цели исследования; «Материал и методы» — с детальным описанием объектов исследований, методических приёмов и квалификаций использованных реагентов (фирм-изготовителей); «Результаты исследований» и «Обсуждение результатов» или «Результаты и обсуждение», «Заключение» или «Выводы» (по пунктам); «Литература» — с указанием цитируемых источников. В конце статьи приводятся «Сведения об авторах»: фамилия, имя и отчество полностью, учёная степень, звание, должность, место работы. Для автора, ответственного за переписку, указываются: почтовый адрес для корреспонденции, e-mail и телефон.

6. Таблицы должны быть пронумерованы, **иметь названия**, заголовки граф точно соответствовать их содержанию, а цифры в таблицах — цифрам в тесте. Необщепринятые сокращения в графах не допускаются. На каждую таблицу в тексте статьи должны быть **сноски**.

7. Иллюстрации (графики, диаграммы, формулы) должны быть чёткими, фотографии — контрастными. В рукописи на обороте каждого рисунка указывается фамилия первого автора статьи, номер рисунка, обозначается верх рисунка. В тексте статьи обязательны ссылки на рисунок. Рисунки и таблицы не должны дублировать друг друга. Для графиков и диаграмм отмечается, **что дано по осям координат** на приведённых кривых и т. п.

8. В формулах должны быть чётко **размечены все элементы**: строчные (m) и прописные (M) буквы, синим подчёркнуты латинские буквы, красным — греческие (с вынесением разметки на поля), чётко

выделяются подстрочные и надстрочные индексы; в случае цифр и букв, сходных по написанию (0 — цифра, O — буква), должны быть сделаны соответствующие пометки.

9. **Сокращения слов, названий** (кроме общепринятых сокращений мер физических, химических, а также математических величин и терминов) **не допускаются**. Меры даются по Международной системе единиц (СИ) в русском обозначении, температура по шкале Цельсия.

10. Латинские названия микроорганизмов приводятся в соответствии с современной классификацией. При первом упоминании название микроорганизма даётся полностью — род и вид (например, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces lividans*), при повторном упоминании **родовое название сокращается** до одной буквы (*E.coli*, *S.aureus*, *S.lividans*).

11. Названия генетических элементов даются в трёхбуквенном обозначении латинского алфавита строчными буквами, курсивом (tet), кодируемыми соответствующими генетическими элементами продукты — прописными прямыми буквами (TET).

12. В журнале используются **международные непатентованные названия** (МНН) препаратов. Торговые (патентованные) названия, под которыми препараты выпускаются различными фирмами, приводятся в разделе «Материал и методы», с указанием фирмы-изготовителя и их международным непатентованным названием.

13. **Цитируемые источники литературы** во всех видах публикаций нумеруются в порядке их упоминания в тексте статьи арабскими цифрами и заключаются в квадратные скобки. В пристатейном списке литературы каждый источник следует помещать с новой строки под порядковым номером. Количество цитируемых работ в оригинальных статьях и лекциях допускается до 40 источников, в обзора — до 100 источников. В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Указываются фамилия, инициалы автора, название статьи, журнала, год, том, номер журнала, номера страниц «от» и «до»; в случае монографии — фамилия и инициалы автора (редактора), название, город, издательство, год, количество страниц.

Недопустимо сокращать названия статей и названия отечественных журналов. Названия англоязычных журналов следует приводить в сокращении в соответствие с каталогом названий базы данных MedLine, если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название.

Оформление списка литературы должно удовлетворять требованиям РИНЦ и международных баз данных. В связи с этим, в ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице. То есть, библиографические описания ссылок на русскоязычные источники должны состоять из двух частей: русскоязычной и латиноязычной (подряд). При этом сначала следует приводить русскоязычную часть описания, затем — латиноязычную. Желательно вставлять Doi статьи.

Таким образом, если статья написана на латинице, то она должна быть процитирована в оригинальном виде:

Lang P.O., Michel J.P., Zekry D. Frailty syndrome: A transitional state in a dynamic process. Gerontology. 2009; 55 (5): 539–549.

Если статья написана на кириллице и у статьи есть официальный перевод названия, его нужно вставить в квадратных скобках после оригинального написания библиографической ссылки на источник. Если нет официального перевода, то нужно привести транслитерацию всей ссылки сразу после ссылки в оригинальном исполнении. В конце ссылки в квадратных скобках вставляется *in Russian*, без точки в конце:

Ткачева О.Н., Рунихина Н.К., Остапенко В.С. Валидация опросника для скрининга синдрома старческой астении в амбулаторной практике. Успехи геронтологии. 2017; 30 (2): 236–242. [Tkacheva O.N., Runikhina N.K., Ostapenko V.S. Validacija oprosnika dlja skrinininga sindroma starncheskoj astenii v ambulatornoj praktike. Uspeхи Gerontologii 2017; 30 (2): 236–242. (in Russian)]

14. Статьи, ранее опубликованные или направленные в какой-либо другой журнал или сборник, не должны присыпаться.

15. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

16. Статьи, принятые в журнал, проходят рецензирование. Рукописи отклонённых работ редакция не возвращает.

17. Редакция и издательство не несут ответственности за мнения, изложенные в публикациях, а также за содержание рекламы.