

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 68



9–10'2023

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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



Подписка через объединённый
каталог «Пресса России»
или через «Агентство «КнигаСервис»:
подписной индекс — 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: октябрь 2023

Свободная цена

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 68

9–10'2023

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

Научные редакторы

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.
Богуш Т. А.
Васильев А. Н.
Волжанин В. М.
Дмитриева Н. В.
Захарова Ю. А.

Зуева Л. П.
Клясова Г. А.
Ленёва И. А.
Митрохин С. Д.
Тец В. В.
Ших Е. В.

Founders:

ISSN 0235-2990

**Ministry of Health
of the Russian Federation**

State Scientific Center for Antibiotics

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

Founded in 1956

Editorial office address:

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

Advertising Department:

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

Publisher:

Izdatelstvo «OKI»



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

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

Circulation: 5000 copies

Tipography:
ООО «Литера»

Release Date: October 2023
Free price

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

ANTIBIOTIKI I KHIOTERAPIYA

Volume 68

9–10'2023

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

Scientific Editors

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

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Natalia N. Besednova
Tatyana A. Bogush
Andrey N. Vasiliev
Valeriy M. Volzhanin
Natalya V. Dmitrieva
Yuliya A. Zakharova

Lyudmila P. Zueva
Galina A. Klyasova
Irina A. Leneva
Sergey D. Mitrokhin
Victor V. Tets
Evgenia V. Shikh

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

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

Экспериментальные статьи

- Матосова Е. В., Беседнова Н. Н., Кусайкин М. И.,
Андрюков Б. Г., Макаренко И. Д., Щелканов М. Ю.,
Ляпун И. Н., Бынина М. П.,
Ермакова С. П., Звягинцева Т. Н.
Антибиоплёночная активность
фукоиданов бурых водорослей
- Макаревич Е. В., Проценко М. А.,
Мазурков О. Ю., Филиппова Е. И., Мазуркова Н. А.
Экспериментальные образцы препаратов
на основе цетрарии исландской (*Cetraria islandica*),
проявляющие противовирусную активность
в отношении вируса гриппа А
- Волков А. Г., Кононова Л. И., Коробов В. П., Волкова Л. В.
Изучение молекулярных параметров
и антибактериальная активность пептидного препарата,
полученного из лейкоцитов человека
- Гостев В. В., Калиногорская О. С., Сулян О. С.,
Чулкова П. С., Сопова Ю. В., Велижанина М. Е.,
Плешков В. Ю., Агеев В. А., Сидоренко С. В.
Влияние шоковых концентраций гентамицина
на формирование устойчивости
и мелкоколониальных фенотипов у *Staphylococcus aureus*
- Разгуляева Д. Н., Клабуков А. М., Галочкина А. В.,
Гаршинина А. В., Журавская О. Н., Гаврилова И. И.,
Манахов В. А., Нестерова Н. А., Штро А. А., Панарин Е. Ф.
Оценка противовирусной активности препаратов
группы производных полимерных электролитов
в отношении широкого спектра вирусов
- Евтеев В. А., Семенова И. С., Бунятян Н. Д.,
Прокофьев А. Б., Кукес В. Г.
Изучение нефротоксичности антибактериальных ЛС
на клеточной линии RPTEC
- Зарубаев В. В., Гаршинина А. В., Есаулкова Я. Л.,
Михальский М. Г., Смирнов В. С., Кудрявцева Т. А.,
Петленко С. В., Запутанов В. А.
Изучение протективной активности
препарата «Тимоген®», спрей назальный дозированный,
на модели экспериментальной гриппозной пневмонии
у лабораторных животных
- Генатуллина Г. Н.
Изучение противомикробной активности
стафилококкового бактериофага
на модели инфицированной кожной раны

Original Articles

- 5 Matosova Ekaterina V., Besednova Natalia N., Kusaykin Mikhail I.,
Andryukov Boris G., Makarenkova Iona D.,
Shchelkanov Mikhail Yu., Lyapun Irina N., Bynina Marina P.,
Ermakova Svetlana P., Zvyaginseva Tatyana N.
Antibiofilm Activity of Fukoidans Isolated
from Brown Algae
- 12 Makarevich Elena V., Protsenko Mariya A.,
Mazurkov Oleg Yu., Filippova Ekaterina I., Mazurkova Natalia A.
Experimental Medications Made
with *Cetraria Islandica* Showing Antiviral Activity
against Influenza A Virus
- 20 Volkov Alexander G., Kononova Lyudmila I.,
Korobov Vladimir P., Volkova Larisa V.
Study of Molecular Parameters and Antibacterial Activity
of a Peptide Preparation Derived from Human Leukocytes
- 25 Gostev Vladimir V., Kalinogorskaya Olga S., Sulian Ofeliia S.,
Chulkova Polina S., Sopova Julia V., Velizhanina Maria E.,
Pleshkov Vyacheslav Y., Ageevets Vladimir A., Sidorenko Sergey V.
The Effect of Shock Gentamicin Concentrations
on the Formation of Resistance and Small Colony Variants
in *Staphylococcus aureus*
- 34 Razgulyaeva Daria N., Klabukov Artyom M., Galochkina Anastasia V.,
Garshinina Anzhelika V., Zhuravskaya Olga N., Gavrilova Irina I.,
Manakhov Vitaly A., Nesterova Natalya A.,
Shtro Anna A., Panarin Evgeniy F.
Evaluation of the Antiviral Activity of Drugs from The Group
of Polymer Electrolyte Derivatives against a Wide Range of Viruses
- 42 Evteev Vladimir A., Semenova Irina S., Bunyatyan Natalya D.,
Prokofiev Aleksey B., Kukes Vladimir G.
Study of Antibacterial Drugs' Nephrotoxicity
in the RPTEC Cell Line
- 46 Zarubaev Vladimir V., Garshinina Anzhelika V., Esaulkova Yana L.,
Mihalskij Mikhail G., Smirnov Vyacheslav S.,
Kudryavtseva Tatiana A., Petlenko Sergey V., Zaplutanov Vasilii A.
Study of the Protective Activity of Thymogen® Dosed
Nasal Spray on a Model of Experimental Influenza Pneumonia
in Laboratory Animals
- 58 Genatullina Guzel N.
Study of the Antimicrobial Activity
of Staphylococcal Bacteriophage
on a Model of an Infected Skin Wound

* 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.

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

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

Клинические исследования и практика

Clinical Research and Practice

- Жданов К. В., Мальцев О. В., Касьяненко К. В.,
Козлов К. В., Сукачев В. С.,
Львов Н. И., Шарабханов В. В.*
Новые подходы к этиотропной терапии пациентов
с ОРВИ препаратом риамилловир 63 *Zhdanov Konstantin V., Maltsev Oleg V., Kasyanenko Kristina V.,
Kozlov Konstantin V., Sukachev Vitalii S., Lvov Nikolai I.,
Sharabhanov Valerian V.*
New Approaches to Etiotropic Therapy
of ARVI patients with Riamilovir
- Митрохин С. Д., Алешкин А. В., Галицкий А. А., Шкода А. С.*
Стратегия и тактика антибактериальной терапии
госпитальных инфекций в настоящее время:
уроки прошедшей пандемии COVID-19 72 *Mitrokhin Sergey D., Aleshkin Andrey V.,
Galitsky Anton A., Shkoda Andrey S.*
Present Strategy and Tactics of Antibacterial Therapy for Hospital
Infections: Lessons Learned from the COVID-19 Pandemic
- Коломиец В. М., Коваленко А. Л., Павленко Е. П.,
Петров А. Ю., Таликова Е. В.*
Предикторы эффективности психологического
сопровождения основного курса лечения
туберкулёза лёгких 79 *Kolomiets Vladislav M., Kovalenko Aleksey L., Pavlenko Elizaveta P.,
Petrov Andrey Yu., Talikova Ekaterina V.*
Predictors of the Effectiveness of Psychological Support
in Addition to the Base Treatment
in Pulmonary Tuberculosis

Обзоры

Reviews

- Змитрукевич А. С., Мамедова А. Е.*
Кардиотоксичные лекарственные средства
при лечении COVID-19 85 *Zmitrukevich Andrei S., Mamedova Anastasiya E.*
Cardiotoxic Drugs Used
in the Treatment of COVID-19
- Хрянин А. А.*
Устойчивость к противомикробным препаратам
при инфекциях, передаваемых половым путем:
современные тенденции 93 *Alexey A. Khryanin*
Antimicrobial Resistance
in Sexually Transmitted Infections:
Current Trends

Рецензия

- Козлов Р. С.*
Рецензия на монографию С. К. Ярового, А. Л. Хохлова
«Практические вопросы рациональной
антибактериальной терапии» 102 *Kozlov Roman S.*
Review of the Monograph
by S. K. Yarovoy, A. L. Khokhlov
«Practical Issues of Rational Antibacterial Therapy»

Некролог

Obituary

- Памяти Беседновой Наталии Николаевны
(02.02.1935 — 23.09.2023) 103 *In memory of Natalia Nikolaevna Besednova
(02/02/1935 — 09/23/2023)*

* 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.

Антибиоплёночная активность фукоиданов бурых водорослей

*Е. В. МАТОСОВА¹, Н. Н. БЕСЕДНОВА¹, М. И. КУСАЙКИН²,
Б. Г. АНДРЮКОВ¹, И. Д. МАКАРЕНКОВА¹, М. Ю. ЩЕЛКАНОВ¹,
И. Н. ЛЯПУН¹, М. П. БЫНИНА¹, С. П. ЕРМАКОВА², Т. Н. ЗВЯГИНЦЕВА²

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

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

Antibiofilm Activity of Fukoidans Isolated from Brown Algae

*EKATERINA V. MATOSOVA¹, NATALIA N. BESEDNOVA¹, MIKHAIL I. KUSAYKIN²,
BORIS G. ANDRYUKOV¹, ILONA D. MAKARENKOVA¹,
MIKHAIL YU. SHCHELKANOV¹, IRINA N. LYAPUN¹, MARINA P. BYNINA¹,
SVETLANA P. ERMAKOVA², TATYANA N. ZVYAGINTSEVA²

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

² G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia

Резюме

Биоплёнки играют значительную роль в существовании бактерий в неблагоприятных условиях и патогенезе инфекций. Они способствуют созданию резервуаров резистентных к антибиотикам возбудителей. Это определяет актуальность поиска биологически активных веществ, ингибирующих формирование биоплёнок. В последние годы объектом интенсивного изучения являются фукоиданы — сульфатированные полисахариды из морских бурых водорослей, обладающие широким полифункциональным спектром действия. В работе исследовали их влияние на формирование биоплёнки *Yersinia pseudotuberculosis* в динамической модели, имитирующей естественные условия экосистем фукоиданов, принадлежащих к разным структурным группам. Они синтезируются бурными водорослями *Fucus evanescens*, *Saccharina cichorioides* и *Saccharina japonica*. Наиболее выраженной антибиоплёночной активностью обладал фукоидан из *F. evanescens*. Авторами разработан новый подход, позволяющий получать устойчивые результаты разнонаправленного действия сульфатированных полисахаридов на биоплёнокообразование *Y. pseudotuberculosis*.

Ключевые слова: биоплёнки; *Yersinia pseudotuberculosis*; ингибирование; фукоиданы (сульфатированные полисахариды); бурые водоросли

Для цитирования: Матосова Е. В., Беседнова Н. Н., Кусайкин М. И., Андрюков Б. Г., Макаренкова И. Д., Щелканов М. Ю., Ляпун И. Н., Бынина М. П., Ермакова С. П., Звягинцева Т. Н. Антибиоплёночная активность фукоиданов бурых водорослей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68 (9–10): 5–11. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-5-11>.

Abstract

Biofilms play a significant role in the existence of bacteria under adverse conditions and the pathogenesis of infections. They contribute to the creation of reservoirs of antibiotic-resistant pathogens. This determines the relevance of the search for biologically active substances that inhibit the formation of biofilms. In recent years, the objects of intensive study are fucoidans — sulfated polysaccharides from marine brown algae, which have a wide polyfunctional spectrum of action. Their influence on the formation of *Yersinia pseudotuberculosis* biofilm in a dynamic model simulating the natural conditions of ecosystems of fucoidans belonging to different structural groups was investigated in this study. They are synthesized by brown algae: *Fucus evanescens*, *Saccharina cichorioides*, and *Saccharina japonica*. The fucoidan isolated from *F. evanescens* have showed the most pronounced antibiotic activity. The authors developed a new approach that allows obtaining stable results of multidirectional action of sulfated polysaccharides on the biofilm formation of *Y. pseudotuberculosis*.

Keywords: biofilms, *Yersinia pseudotuberculosis*, inhibition, fucoidans (sulfated polysaccharides), brown algae.

For citation: Matosova E. V., Besednova N. N., Kusaikin M. I., Andryukov B. G., Makarenkova I. D., Shchelkanov M. Yu., Lyapun I. N., Bynina M. P., Ermakova S. P., Zvyagintseva T. N. Antibiofilm activity of fucoidans isolated from brown algae. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 5–11. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-5-11>.

Введение

В естественной среде обитания бактерии формируют биоплёнки — заключённые в матриксе структурированные микробные сообщества, фиксированные к поверхности и объединённые си-

стемой Quorum Sensing [1, 2]. Существование в составе биоплёнок позволяет бактериям выживать в неблагоприятных условиях, в организме противостоять факторам врождённого иммунитета, а также защищаться от воздействия антибактериальных средств, значительно снижая эффектив-

© Коллектив авторов, 2023

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

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 1 Selskaya st., G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087 Russia. E-mail: e_matosova@mail.ru

ность антибиотикотерапии и создавая резервуары возбудителей инфекции на различных поверхностях, в том числе медицинского назначения [2].

Бактерии рода *Yersinia* в течение последних десятилетий занимают особое место среди возбудителей сапронозных инфекций благодаря своим уникальным психрофильным свойствам, позволяющим им выживать и сохранять патогенность в различных условиях окружающей среды, и в том числе при попадании в морские экосистемы. Способность к спонтанному заражению этими бактериями наземных и морских организмов свидетельствует об отсутствии специфического хозяина и о повсеместном распространении этих микроорганизмов в окружающей среде [3–5].

Среди патогенных иерсиний повышенное внимание уделяется виду *Y.pseudotuberculosis*, у которого биоплёнкообразование является важным фактором патогенности [3–6], а также эволюционно близкому к нему высоковирулентному возбудителю чумы — *Yersinia pestis*, образующему биоплёнку в желудочно-кишечном тракте блох [1, 5, 7]. Полимерный матрикс, входящий в состав биоплёнки *Yersinia*, содержит гомополимер N-ацетил-D-глюкозамина, синтез которого регулируется на генетическом уровне [1, 3]. Оба патогена имеют высокую степень геномной гомологии, и формирование биоплёнки, имеющей ключевое значение в патогенезе этих инфекций, регулируется идентичным генетическим опероном hmsHFRS [6, 8]. Такое близкое родство возбудителей обуславливает актуальность поиска и разработки препаратов, обладающих антибиоплёночным действием в отношении *Y.pseudotuberculosis*. Особый интерес для исследования представляют водорастворимые, сульфатированные полисахариды (СПС) — фукоиданы из морских бурых водорослей обладающие уникальной химической структурой, биосовместимостью и биodeградируемостью, низкой токсичностью и широким спектром фармакологического действия [9–13].

Многочисленные исследования выявили ряд ассоциативных механизмов антибактериального действия фукоиданов (иммуномодулирующее, антиадгезивное, бактериостатическое, бактерицидное) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе, против *Y.pseudotuberculosis* [12, 13]. С учётом важного патогенетического значения биоплёнок в развитии хронических инфекций, связанных с бактериями рода *Yersinia*, исследование антибиоплёночного действия фукоиданов представляет научный и практический интерес.

Цель исследования — изучение влияния фукоиданов разной структуры на формирование биоплёнки *Yersinia pseudotuberculosis* в динамической модели, имитирующей естественные условия экосистем.

Материал и методы

Культура. В работе использовали вирулентный штамм *Y.pseudotuberculosis* № 512 I серовара из коллекции микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора. Бактерии выращивали на скошенном агаре (АО «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия) в течение 48 ч при температуре +4–6°C. Далее готовили взвесь бактерий в растворе бульона Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия) с 0,85% раствором NaCl в соотношении 1:2 до концентрации 10^6 мк/мл (по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича).

Сульфатированные полисахариды. В работе исследовали различные по химической структуре СПС из бурых водорослей Тихого океана — *Fucus evanescens*, *Saccharina cichorioides* и *Saccharina japonica*, выделенные в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН [14] и очищенные с помощью ионообменной хроматографии [15].

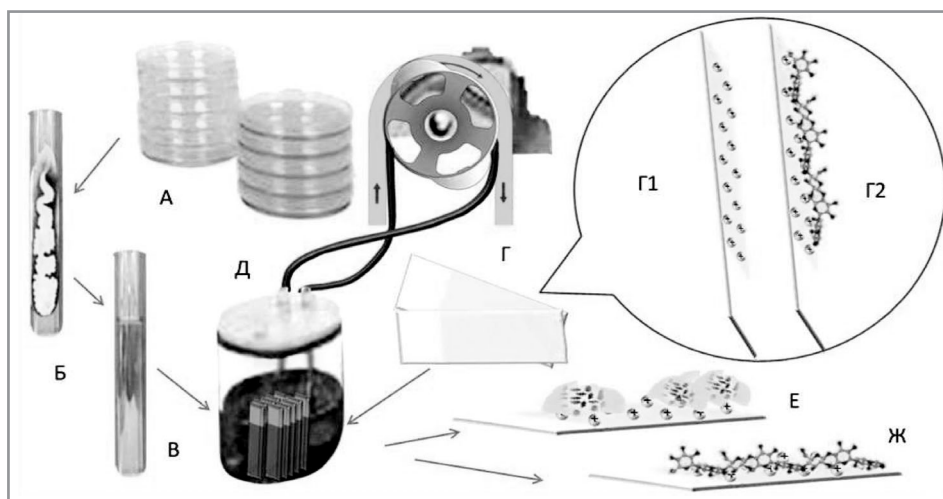
Выращивание биоплёнки. Для выращивания биоплёнки в качестве абиотической подложки использовались слайды со специальным адгезивным покрытием производства компании ThermoFisher Scientific (США) — Superfrost™ Plus (с постоянным положительным зарядом на поверхности) и Polysine™ Adhesion Slides (с электростатической и биохимической адгезией). Исследуемые полисахариды в виде водных растворов сухих экстрактов (1, 10 и 20 мг/мл) сорбировались на поверхность слайдов в течение 10 мин при комнатной температуре (не связавшиеся фукоиданы смывали проточной дистиллированной водой). В качестве контроля использовались соответствующие типы слайдов без полисахаридов, инкубированные в аналогичных условиях.

Динамическая модель формирования биоплёнки. Для исследования формирования биоплёнки применялась динамическая модель [16], представляющая собой закрытую систему, состоящую из перистальтического насоса и проточной камеры — широкогорлого химического стакана (600 мл) с крышкой и полихлорвиниловыми трубками. Трубки соединялись с перистальтическим насосом (Суперстальтик-02, Россия), создающим регулируемый ток жидкости (50 мл/мин) необходимый для инициирования процесса образования биоплёнки.

Суть метода заключалась в инокулировании планктонных форм *Y.pseudotuberculosis* в смесь бульона Хоттингера с 0,85% раствором NaCl (1:2), которая циркулировала в закрытой системе. Слайды с фукоиданами помещали вертикально в ёмкость с суспензией *Y.pseudotuberculosis* и инкубировали в течение 72 ч при комнатной температуре. После инкубации слайды трёхкратно промывали дистиллированной водой для освобождения от планктонных форм бактерий (рисунок).

Количественную оценку биомассы биоплёнки проводили путём измерения оптической плотности окрашенных препаратов. Для окрашивания слайдов использовался метод Sternheimer–Malbin [2]: 2-компонентный краситель (А — кристаллический фиолетовый 3,0 г, этиловый спирт 95%, 20,0 мл, дистиллированная вода 80,0 мл и оксалат аммония 0,8 г; Б — сафранин О, 0,25 г, этиловый спирт 95%, 10,0 мл, дистиллированная вода 90,0 мл) смешивали в отношении 1:1 перед постановкой реакции. Слайды помещали в готовый краситель вертикально, окрашивали 15 мин, после чего промывали дистиллированной водой. Окраска биоплёнок основывалась на способности компонентов красителя (кристаллического фиолетового и сафранина) связываться с матриксом биоплёнок [2, 17, 18]. Окрашенные слайды подсушивали на воздухе 5 мин и измеряли экстинкции в 60 разных точках поверхности слайдов на спектрофотометре АКЩ-01 (светофильтр 595 нм).

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 7. Для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков использовали *t*-критерий Стьюдента. Проверку гипотезы о нормальности распределения проводили по количественным ха-



Динамическая модель формирования биоплёнки *Y. pseudotuberculosis* под влиянием фукоиданов из бурых водорослей.

Примечание. А — выделение чистой культуры *Y. pseudotuberculosis*; Б — накопление бактериальной массы на скошенном агаре; В — инокулирование планктонных форм бактерий в смесь бульона Хоттингера с 0,85% раствором NaCl (1:2); Г — слайды со специальным адгезивным покрытием в качестве абиотической подложки: Г1 — слайды без фукоидана для контроля эксперимента; Г2 — слайды с сорбированным на поверхности фукоиданом; Д — культивирование биоплёнки на слайдах в динамической закрытой системе; Е — слайды контроля со сформированной биоплёнкой *Y. pseudotuberculosis*; Ж — ингибирование роста биоплёнки на слайдах с фукоиданом.

Dynamic model of *Y. pseudotuberculosis* biofilm formation under the influence of fucoidans isolated from brown algae.

Note. А — isolation of a pure culture of *Y. pseudotuberculosis*; Б — accumulation of bacterial mass on agar slants; В — inoculation of planktonic forms of bacteria into a mixture of Hottinger broth with 0.85% NaCl solution (1:2); Г — slides with a special adhesive coating as an abiotic substrate: Г1 — slides without fucoidan to control the experiment; Г2 — slides with fucoidan sorbed on the surface; Д — biofilm cultivation on slides in a dynamic closed system; Е — control slides with a formed *Y. pseudotuberculosis* biofilm; Ж — inhibition of biofilm growth on slides with fucoidan.

рактическим распределением (коэффициенты асимметрии и эксцесса, равенству дисперсий и критерию Пирсона, уровень значимости $\alpha=0,05$). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равный 0,05.

Результаты

На первом этапе решалась задача выбора подложки, оптимальной для формирования биоплёнки. Расчёт показателей коэффициентов вариации разбросов (V_x) полученных значений оптической плотности показал, что положительный заряд слайдов SuperFrost™ Plus Adhesion Slides обеспечивает более равномерные адгезивные характеристики поверхности. Это создавало незначительную степень рассеивания данных (среднее значение $V_x=8,58$ при $n=720$). Поэтому последующая оценка результатов проводилась только на основании данных, полученных на этих слайдах.

В работе использовались фукоиданы, различающиеся по структуре (табл. 1).

Анализ действия полностью сульфатированного (1→3)- α -L-фукана, выделенного из *S. cicho-*

roides, показал отсутствие статистически значимого ингибирования формирования биоплёнки. При концентрациях полисахарида 10 и 20 мг/мл наблюдалась индукция роста биоплёнки ($p<0,001$) (табл. 2).

При анализе результатов влияния на формирование биоплёнок частично ацетилированного 1→3- α -L-фукана с высоким содержанием галактозы из *S. japonica* было установлено, что в высокой (20 мг/мл) и средней (10 мг/мл) концентрациях полисахарид вызывал статистически значимое ($p<0,001$) и равномерное ($V=5,99$) ингибирование роста биоплёнки (табл. 3).

Наиболее интересные результаты, по мнению авторов, получены при исследовании частично ацетилированного 1→3;1→4- α -L-фукана из *F. evanescens*. Ингибирование роста биоплёнки *Y. pseudotuberculosis* было статистически значимым ($p<0,001$) и достигало 29%

по сравнению с контролем. Как и в случае с результатами, полученными при использовании фукоидана из *S. japonica*, подавление роста биоплёнки имело зависимость от концентрации полисахарида и было наиболее выраженным в концентрации 10 и 20 мг/мл (табл. 4).

Обсуждение

Согласно оценкам Международного центра по контролю за заболеваниями (CDC) и Американского национального института здоровья (NIH), 65–80% всех бактериальных инфекций во всём мире связаны с биоплёнками [2, 22]. Как правило, возбудители хронических инфекций характеризуются высокой устойчивостью к антибиотикам и выраженной способностью уклоняться от иммунной системы макроорганизма [2, 6, 23]. Важной особенностью является то, что биоплёнки, преимущественно, образуются в среде с током жидкости [22].

Во всём мире ведётся активный поиск средств борьбы с биоплёночными инфекциями. Огромное химическое разнообразие веществ,

Таблица 1. Структурные характеристики фукоиданов

Table 1. Structural characteristics of fucoidans

Источник фукоидана	Моносахаридный состав Fuc/Gal/Man/Xyl/Rha	SO ₃ ⁻ , %	Молекулярная масса, кДа фукозы	Тип связей между остатками	Ссылка
<i>S.cichorioides</i>	98/2/0/0/0	36	773	α -(1→3)	[19]
<i>S.japonica</i>	57/31/1/2/3	23	160	α -(1→3)	[20]
<i>Fevanescens</i>	92,1/5,3/0/2,6/0	32,7	340	α -(1→3);(1→4)	[21]

Таблица 2. Влияние фукоидана, выделенного из бурых водорослей *S.cichorioides*, на формирование биоплёнок *Y.pseudotuberculosis*

Table 2. Effect of fucoidan isolated from brown algae *S.cichorioides* on the formation of *Y.pseudotuberculosis* biofilms

Показатели	Концентрация <i>S.cichorioides</i> , мг/мл			Контроль
	1,0	10,0	20,0	
Оптическая плотность ($M \pm SD$), у. е.	60,65±4,43	65,33±6,86	65,28±6,51	61,60±5,13
Коэффициент вариации (V), %	7,31	10,50	9,97	8,32
Число наблюдений (n)	60	60	60	60
Значимость различий с контролем, (p)	$p=0,279$	$p=0,001$	$p=0,001$	

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: $M \pm SD$ (Mean±Standard Deviation) — средняя арифметическая величина ± стандартное отклонение; p — значимость полученных значений по сравнению с контролем (t -критерий Стьюдента).
Note. Here and in Tables 3, 4: $M \pm SD$ (Mean±Standard Deviation) — arithmetic mean ± standard deviation; p — significance of the obtained values compared to the control (Student's t -test).

Таблица 3. Влияние фукоидана, выделенного из бурых водорослей *S.japonica*, на формирование биоплёнок *Y.pseudotuberculosis*

Table 3. Effect of fucoidan isolated from brown algae *S.japonica* on the formation of *Y.pseudotuberculosis* biofilms

Показатели	Концентрация <i>S.japonica</i> , мг/мл			Контроль
	1,0	10,0	20,0	
Оптическая плотность ($M \pm SD$), у. е.	41,15±3,88	38,20±1,81	38,25±2,77	42,15±3,00
Коэффициент вариации, V, %	9,44	4,74	7,23	7,12
Число наблюдений, n	60	60	60	60
Значимость различий с контролем, (p)	$p=0,117$	$p=0,000$	$p=0,000$	

Таблица 4. Влияние фукоидана, выделенного из бурых водорослей *Fevanescens*, на формирование биоплёнок *Y.pseudotuberculosis*

Table 4. Effect of fucoidan isolated from brown algae *Fevanescens* on the formation of *Y.pseudotuberculosis* biofilms

Показатели	Концентрация <i>Fevanescens</i> , мг/мл			Контроль
	1,0	10,0	20,0	
Оптическая плотность ($M \pm SD$), у. е.	63,52±7,62	58,27±4,54	58,60±5,44	81,23±7,49
Коэффициент вариации, V, %	11,99	7,78	9,28	9,22
Число наблюдений, n	60	60	60	60
Значимость различий с контролем, (p)	$p=0,000$	$p=0,000$	$p=0,000$	

биосинтезируемых морскими водорослями обеспечивает богатый потенциал для изучения и разработки новых соединений, способных ингибировать бактериальную колонизацию и образование биоплёнки, что может иметь решающее значение для создания альтернативной стратегии борьбы с антибиотикорезистентными бактериальными инфекциями.

В качестве тестового микроорганизма для исследования нами был выбран штамм *Y. pseudotuberculosis*, что связано с ключевой ролью в жизненном цикле возбудителей сапронозной инфекции биоплёнки, опосредующей выживание и сохранение патогенных свойств этих бактерий не только в организме, но и в объектах окружающей среды [1, 6].

Нами была использована динамическая модель образования биоплёнки *Y.pseudotuberculosis*

в закрытой проточной системе, что позволяет точно моделировать естественные условия образования биоплёнок [16].

Ранее проведённые исследования показали, что, как и все бентосные морские фотосинтезирующие организмы, бурые водоросли способны вырабатывать эффективные биологически активные вещества, главным компонентом которых являются полисахариды, не имеющие аналогов в наземных организмах и обладающие разновекторным биологическим действием [12, 13, 23, 24]. Биоактивность фукоиданов обусловлена структурными особенностями молекул фукоиданов, с которыми исследователи связывают ингибирование адгезии, блокирование образования клеточной стенки грамотрицательных бактерий, активности гиалуронидазы и индукцию их гибели [12, 14, 24, 25].

Для стандартизации условий, независимых от качества и свойств используемого материала, при выращивании биоплёнки был экспериментально определён тип абиотической подложки — слайды Superfrost™ Plus со специальным равномерным адгезивным покрытием.

Использованный в настоящей работе двухкомпонентный краситель по Sternheimer–Malbin, по мнению R. R. Haug [2], является наиболее предпочтительным для окраски биомассы биоплёнки. При этом входящий в состав кристаллический фиолетовый является основным красителем и связывается с отрицательно заряженными поверхностными молекулами полисахаридов матрикса [18]. Сафранин суправитально окрашивает бактериальные клетки в биоплёнке, которые при этом сохраняют подвижность, что даёт возможность оценить их жизнеспособность [2, 18].

Применённый метод вертикального сканирования окрашенных биоплёнок позволил получить сравнительные 720 количественных значений оптической плотности и провести их последующий статистический анализ.

Был выявлен низко вариабельный равномерный эффект статистически значимого ингибирования формирования биоплёнки под влиянием фукоиданов, выделенных из *S. japonica* (в высоких и средних концентрациях) и *Fevanescens*. При этом подавление биоплёнокообразования *Y.pseudotuberculosis* фукоиданами, выделенными из *Fevanescens*, было наиболее выраженным при всех исследуемых концентрациях полисахарида на слайдах (1, 10 и 20 мг/мл). Выявленная индукция роста биоплёнки под действием фукоидана из *S.cichorioides* была расценена авторами как следствие повышения шероховатости и рельефа поверхности слайдов в концентрациях 10 и 20 мг/мл.

Из проведённых ранее исследований известно, что одно из направлений антибиоплёночного действия фукоиданов может быть связано с механизмами подавления начальной стадии формирования биоплёнки — адгезии бактерий, которая опосредуется целым рядом факторов колонизации [16, 24, 26].

Значение этого механизма у СПС в отношении *Y.pseudotuberculosis* приобретает особую важность, поскольку у этого вида бактерий адгезия является не только начальным звеном биоплёнокообразования, но и ключевым этапом патогенеза псевдотуберкулёзной инфекции. Адгезия необходима микробу для его прикрепления к поверхности клеток слизистых оболочек кишечника и последующей инвазии в них и осуществляется при помощи пилей и компонентов наружной мембраны [1, 3, 6].

Учитывая идентичность химического состава биоплёнок у *Y.pseudotuberculosis* и *Y.pestis*

и единый механизм генетической регуляции их формирования, полученные результаты можно интерполировать на природные штаммы возбудителей псевдотуберкулёза и чумы.

По мнению A. Buseti и др. [24] механизм и выраженность ингибирующего антиплёночного эффекта полисахаридов бурых водорослей зависит от типа тестовых микроорганизмов — грам-отрицательных или грамположительных бактерий и от химической структуры фукоиданов. В свою очередь, химический состав полисахаридов и их биологические свойства зависят от вида водорослей, места обитания и времени сбора водорослей [12, 14, 27].

Исследованные в работе фукоиданы бурых водорослей дальневосточных морей являются представителями разных структурных групп [12, 14, 15, 19–21]. Углеводная цепь СПС, выделенных из *Fevanescens*, состоит из остатков фукозы, связанных чередующимися α -(1→3)- и α -(1→4)-гликозидными связями. Тогда как главная цепь полисахаридов, выделенных из *S.cichorioides* и *S.japonica*, построена по общему для представителей порядка *Laminariales* плану и состоит из остатков фукозы, связанных только α -(1→3)-гликозидными связями. Полисахарид, выделенный из *S. japonica* представляет собой галактофукан, сульфатированный по обоим моносахаридным остаткам. Необходимо отметить, что различия в химической структуре фукоиданов обуславливают и различия в пространственной упаковке их молекул [21], что также может играть важную роль в проявлении биологической активности.

Большинство авторов [12, 13, 23, 24] рассматривает СПС в качестве идеальных и перспективных кандидатов в эффективные антиадгезины, не вызывающие привыкания у бактерий. В связи с этим использование фукоиданов может стать альтернативной стратегией защиты от инфекций.

Морская среда содержит очень богатый источник потенциальных биомедицинских соединений. Среди этих соединений сульфатированные полисахариды, выделенные из бурых водорослей, привлекают особое внимание, особенно в свете поиска антимикробных стратегий, альтернативных современным антибиотикам.

Высокая актуальность проблемы формирования биоплёнки патогенными бактериями в организме и объектах окружающей среды связана с её повышенной устойчивостью к антимикробной терапии и иммунным защитным реакциям, появлением затяжных и хронических инфекций. Научная гипотеза проведённого нами исследования строилась на возможном ингибировании формирования биоплёнок *Y.pseudotuberculosis* сульфатированными полисахаридами, выделенными из бурых водорослей дальневосточных мо-

рей, обладающими широким спектром биологической активности.

Таким образом, полученные результаты позволили установить, что исследованные вещества, принадлежащие к разным структурным группам фукоиданов, обладают ингибирующей активностью в отношении формирования биоплёнки *Y.pseudotuberculosis* на абиотической поверхности. Это было наиболее выражено у полисахаридов, выделенных из водоросли *Fevanescens*. Выявленный биотический эффект позволяет предположить его связь со специфической линейной структурой основной цепи фукоиданов этой группы.

Для суждения об универсальном характере ингибирующего эффекта сульфатированных полисахаридов необходимо продолжить исследования влияния фукоиданов на формирование биоплёнок другими бактериальными моделями, а также ассоциированных с природными биотическими поверхностями.

Литература/References

1. Zhou D., Yang R. Formation and regulation of *Yersinia* biofilms. *Protein & Cell*. 2011; 2: 173–179.
2. Harr R. R. Medical Laboratory Science Review. New York: F. A. Davis Company; 2012.
3. Erickson D.L., Jarrett C.O., Wren B.W., Hinnebusch B.J. Serotype differences and lack of biofilm formation characterize *Yersinia pseudotuberculosis* infection of the *Xenopsylla cheopis* flea vector of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol*. 2006; 188: 1113–1119.
4. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Рассказов В.А. Исследование влияния биологически активных веществ на формирование бактериальных биоплёнок. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2014; 57 (3): 54–55. [Terenteva N.A., Timchenko N.F., Rasskazov V.A. Study of biological active substances on the bacterial biofilm formation. *Health. Medical ecology. Science*. 2014; 57 (3): 54–55. (In Russian)]
5. Масюк А.Г., Елисейкина М.Г., Терентьева Н.А., Долматова Л.С., Тимченко Н.Ф. Влияние биологически активных веществ из морских организмов на формирование биоплёнки *Yersinia pseudotuberculosis* на биотической поверхности. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017; 72 (5): 88–90. doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1115939>. [Masuk A.G., Eliseikina M.G., Terenteva N.A., Dolmatova L.S., Timchenko N.F. Characteristics of the influence of substances from marine organisms on biofilm formation *Yersinia pseudotuberculosis* on biotic surface. *Health. Medical ecology. Science*. 2017; 72 (5): 88–90. doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1115939>. (In Russian)]
6. Guo X.P., Ren G.X., Zhu H., Mao X.J., Sun Y.C. Differential regulation of the hmsCDE operon in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* by the Rcs phosphorelay system. *Sci Rep*. 2015; 5: 8412.
7. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 24 (96): 14043–14048.
8. Fang N., Yang H., Fang H., Liu L., Zhang Y., Wang L. et al. RcsAB is a major repressor of *Yersinia* biofilm development through directly acting on hmsCDE, hmsT, and hmsHFRS. *Sci Rep*. 2015; 5: 9566.
9. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpiniec S.S. Therapies from Fucoidan: An Update. *Mar. Drugs*. 2015; 13: 5920–5946.
10. Макаренкова И.Д., Ахматова Н.К., Ермакова С.П., Беседнова Н.Н. Морфофункциональные изменения дендритных клеток под действием сульфатированных полисахаридов бурых водорослей. *Биомедицинская химия*. 2017; 63 (1): 39–46. doi: <https://doi.org/10.18097/PBMC20176301039>. [Makarenkova I.D., Akhmatova N.K., Ermakova S.P., Besednova N.N. Morphofunctional changes of dendritic cells induced by sulfated polysaccharides of brown algae. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2017; 63 (1): 39–46. doi: <https://doi.org/10.18097/PBMC20176301039>. (In Russian)]
11. Имбс Т.И., Харламенко В.И., Звягинцева Т.Н. Оптимизация процесса экстракции фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*. // *Химия растительного сырья*. 2012; 1: 143–147. [Imbs T.I., Kharlamenko V.I., Zvyagintseva T.N. Optimizatsiya protsessa ehkstratsii fukoidana iz

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Е. В. Матосова — разработка модели, анализ и интерпретация результатов, написание текста, финальное утверждение рукописи; Н. Н. Беседнова — разработка концепции исследования, редактирование текста, финальное утверждение рукописи; М. И. Кусайкин — интерпретация результатов, написание фрагмента текста, финальное редактирование текста, финальное утверждение рукописи; Б. Г. Андрюков — интерпретация результатов, редактирование текста; И. Д. Макаренкова — интерпретация результатов, написание фрагмента текста; М. Ю. Щелканов — разработка концепции исследования, финальное утверждение рукописи; И. Н. Ляпун, М. П. Бынина, Т. Н. Звягинцева — выполнение исследования; С. П. Ермакова — редактирование текста, финальное утверждение рукописи.

- buroj vodorosli *Fucus evanescens*. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2012; 1: 143–147. (in Russian)]
12. Фукоиданы — сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства. Под ред. Н. Н. Беседновой, Т. Н. Звягинцевой. Владивосток: Дальнаука. 2014. [Fukoidany — sul'fatirovannye polisakharidy burykh vodoroslej. *Struktura, fermentativnaya transformatsiya i biologicheskie svoystva*. / N. N. Besednova, T. N. Zvyagintseva (eds). Vladivostok: Dal'nauka; 2014. (in Russian)]
13. Беседнова Н.Н. Морские гидробионты — потенциальные источники лекарств. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2014; 57 (3): 4–10. [Besednova N.N. Sea hydrobionts — potential sources of drugs. *Health. Medical Ecology. Science*. 2014; 57 (3): 4–10. (in Russian)]
14. Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю., Исаков В.В., Глазунов В.П., Звягинцева Т.Н. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика. *Химия растительного сырья*. 2004; 3: 15–24. [Urvantseva A.M., Bakunina I.Yu., Kim N.Yu., Isakov V.V., Glazunov V.P., Zvyagintseva T.N. Vydelenie ochishchenogo fukoidana iz prirodnogo kompleksa s polifenolami i ego kharakteristika. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2004; 3: 15–24. (in Russian)]
15. Kusakyan M.I., Chizhov A.O., Grachev A.A., Alekseeva S.A., Bakunina I.Yu., Nedashkovskaya O.I. et al. A comparative study of specificity of fucoidanases from marine microorganisms and invertebrates. *J Appl Phycol*. 2006; 18 (3–5): 369–373.
16. Sternberg C., Bjarnsholt T., Shirliff M. Methods for dynamic investigations of surface-attached *in vitro* bacterial and fungal biofilms. *Methods Mol Biol*. 2014; 1147: 3–22. doi: [10.1007/978-1-4939-0467-9_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9_1).
17. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998; 28 (3): 449–461. doi: [10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x).
18. Ommen P., Zobek N., Meyer R.L. Quantification of biofilm biomass by staining Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. *J Microbiol Methods*. 2017; 141: 87–89. doi: [10.1016/j.mimet.2017.08.003](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.08.003).
19. Usovteva R., Shevchenko N., Malyarenko O., Anastyuk S., Kasprik A., Zvyagintsev N., Ermakova S. Fucoidans from brown algae *Laminaria longipes* and *Saccharina cichorioides*: Structural characteristics, anticancer and radiosensitizing activity *in vitro*. *Carbohydr Polym*. 2019; 221: 157–165. doi: [10.1016/j.carbpol.2019.05.079](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.079).
20. Zvyagintsev N., Usovteva R., Shevchenko N., Surits V., Imbs T., Malyarenko O., Besednova N., Ivanushko L., Ermakova S. Structural diversity of fucoidans and their radioprotective effect. *Carbohydr Polym*. 2021; 273: 118551. doi: [10.1016/j.carbpol.2021.118551](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118551).
21. Rasin A., Shevchenko N., Silchenko A., Kusakyan M., Likhatskaya G., Zvyagintseva T., Ermakova S. Relationship between the structure of a highly regular fucoidan from *Fucus evanescens* and its ability to form nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2021; 185: 679–687. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2021.06.180](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.180).

22. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15 (2): 167–193.
23. Беседнова Н.Н., Макаренко И.Д., Звягинцева Т.Н., Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С. Ингибирующее действие полисахаридов морских гидробионтов на формирование биоплёнок. *Антибиотики и химиотер.* 2016; 61 (9–10): 64–73. [Besednova N.N., Makarenkova I.D., Zvyagintseva T.N., Kuznetsova T.A., Zaporozhets T.S. Inhibitory effect of polysaccharides of marine hydrobionts on biofilm formation. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2016; 61 (9–10): 64–73. (in Russian)]
24. Busetti A., Thompson T.P., Tegazzini D., Megaw J., Maggs C.A., Gilmore B.F. Antibiofilm activity of the brown alga *Halidrys siliquosa* against clinically relevant human pathogens. *Mar Drugs*. 2015; 13 (6): 3581–3605. doi: 10.3390/md13063581.
25. Запорожец Т.С., Макаренко И.Д., Бакунина И.Ю., Бурцева Ю.В., Кусайкин М.И., Балабанова Л.А. и др. Ингибирование адгезии *C. diphtheriae* к буккальному эпителию человека гликозид гидролазами из морских гидробионтов. *Биомедицинская химия*. 2010; 56 (3): 350–358. [Zaporozhets T.S., Makarenkova I.D., Bakunina I.Y., Burtseva Y.V., Kusaikin M.I., Balabanova L.A., et al. Inhibition of adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to human buccal epithelium by glycoside hydrolases of marine hydrobionts. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2010; 56 (3): 350–358. (in Russian)]
26. Marudhupandi T., Kumar A. Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. *Int Current Pharmaceutical J*. 2013; 10 (2): 156–158.
27. Vasconcelos A.A., Pomin V.H. Marine Carbohydrate-Based Compounds with Medicinal Properties. *Mar Drugs*. 2018; 16 (7): 233. doi: 10.3390/md16070233.

Информация об авторах

Матосова Екатерина Владимировна — научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9968-3347

Беседнова Наталия Николаевна — д. м. н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2760-9778

Кусайкин Михаил Игоревич — д. б. н., заместитель директора по научным вопросам, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

Андрюков Борис Георгиевич — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

Макаренко Илона Дамировна — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0001-6450-840X

Щелканов Михаил Юрьевич — д. б. н., директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, ORCID ID: 0000-0001-8610-7623

Ляпун Ирина Николаевна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5290-3864

Бынина Марина Павловна — младший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8255-328X

Ермакова Светлана Павловна — д. х. н., руководитель лаборатории химии ферментов, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5905-2046

Звягинцева Татьяна Николаевна — д. х. н., главный научный сотрудник лаборатории химии ферментов, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

About the authors

Ekaterina V. Matosova — researcher at the Laboratory of Intestinal Infections, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9968-3347

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

Mikhail I. Kusaikin — D. Sc. in Biology, Deputy Director for Scientific Affairs, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Boris G. Andryukov — D. Sc. in Medicine, Leading Researcher at the Laboratory of Intestinal Infections, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia

Ilona D. Makarenkova — D. Sc. in Medicine, Leading Researcher at the Laboratory of Immunobiological Preparations, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6450-840X

Mikhail Yu. Shchelkanov — D. Sc. in Biology, Director of the G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8610-7623

Irina N. Lyapun — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Pathomorphology, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5290-3864

Marina P. Bynina — Junior Researcher at the Laboratory of Intestinal Infections, G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8255-328X

Svetlana P. Ermakova — D. Sc. in Chemistry, Head of the Laboratory of Enzyme Chemistry, G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5905-2046

Tatyana N. Zvyagintseva — D. Sc. in Chemistry, Chief Researcher at the Laboratory of Enzyme Chemistry, G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Экспериментальные образцы препаратов на основе цетрарии исландской (*Cetraria islandica*), проявляющие противовирусную активность в отношении вируса гриппа А

Е. В. МАКАРЕВИЧ, *М. А. ПРОЦЕНКО, О. Ю. МАЗУРКОВ,
Е. И. ФИЛИППОВА, Н. А. МАЗУРКОВА

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

Experimental Medications Made with *Cetraria Islandica* Showing Antiviral Activity against Influenza A Virus

ELENA V. MAKAREVICH, *MARIYA A. PROTSENKO, OLEG YU. MAZURKOV,
EKATERINA I. FILIPPOVA, NATALIA A. MAZURKOVA

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Резюме

Актуальность. На сегодняшний день вирусологами выявлено более 25000 серотипов вируса гриппа А, и в дальнейшем их число будет увеличиваться. В связи с этим разработка новых противовирусных препаратов, в том числе и против вируса гриппа, актуальна. **Цель исследования** — получение, тестирование химического состава и противовирусной активности экстрактов лишайника *Cetraria islandica* в отношении вируса гриппа А. **Материал и методы.** Для образцов препаратов лишайника *Cetraria islandica* (водный и этанольный экстракты) исследовали токсические свойства и противовирусную активность в отношении вируса гриппа А в культуре клеток MDCK. **Результаты.** Получены и охарактеризованы по химическому составу образцы водного и этанольного экстрактов *Cetraria islandica*. В культуре клеток MDCK экстракты проявляли противовирусную активность в отношении вируса гриппа человека А/Н3N2 и птиц А/Н5N1. При исследовании механизма действия экстрактов *Cetraria islandica* отмечено, что образцы *Cetraria islandica* обладают выраженными противовирусными свойствами в отношении вируса гриппа птиц А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и вируса гриппа человека А/Aichi/2/68 (H3N2) на стадии их адсорбции и репродукции. **Заключение.** Образцы *Cetraria islandica* обладают противовирусной активностью на стадии адсорбции и репродукции вируса гриппа А в культуре клеток MDCK. Этанольный экстракт показывает более высокую противовирусную эффективность по сравнению с водным экстрактом.

Ключевые слова: *Cetraria islandica*; экстракты; противовирусная активность; вирус гриппа

Для цитирования: Макаревич Е. В., Проценко М. А., Мазурков О. Ю., Филиппова Е. И., Мазуркова Н. А. Экспериментальные образцы препаратов на основе цетрарии исландской (*Cetraria islandica*), проявляющие противовирусную активность в отношении вируса гриппа А. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68 (9–10): 12–19. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-12-19>.

Abstract

Background. To date, virologists have identified more than 25,000 influenza virus A serotypes, and their number will increase in the future. Therefore, the development of new antiviral drugs will always be relevant. **The aim** of the study is to obtain and test the chemical composition and antiviral activity of the lichen *Cetraria islandica* extracts against the influenza A virus. **Material and methods.** Samples of lichen *Cetraria islandica* (aqueous and ethanol extracts) were tested for toxic properties and antiviral activity against influenza A virus in MDCK cell culture. **Results.** Samples of aqueous and ethanol extracts of *Cetraria islandica* were obtained; their chemical composition was described. In MDCK cell culture, the extracts exhibited antiviral activity against human influenza virus A/H3N2 and avian influenza virus A/H5N1. When studying the mechanism of action of *Cetraria islandica* extracts, it was noted that *Cetraria islandica* samples possess pronounced antiviral properties against avian influenza A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) and human influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) at the stage of their adsorption and reproduction. **Conclusions.** Samples of *Cetraria islandica* have antiviral activity at the stage of adsorption and reproduction of influenza A virus in MDCK cell culture. The ethanol extract shows a higher antiviral efficacy compared to the aqueous extract.

Keywords: *Cetraria islandica*; extracts; antiviral activity; influenza virus

For citation: Makarevich E. V., Protsenko M. A., Mazurkov O. Yu., Filippova E. I., Mazurkova N. A. Experimental drug samples of the *Cetraria islandica* showing antiviral activity against influenza A virus. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68 (9–10): 12–19. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-12-19>.

Введение

Среди острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) одним из самых распространённых инфекционных заболеваний является грипп, периодически появляющийся в виде эпидемий. На сегодняшний день вирусологами выявлено более 25000 серотипов вируса гриппа А, различающихся между собой антигенным спектром, и в дальнейшем их число будет скорее всего возрастать [1].

Противогриппозные препараты этиотропного действия на сегодняшний день представлены ограниченным спектром лекарственных средств, большинство из которых характеризуются узконаправленным действием, наличием нежелательных побочных эффектов, проявлением токсичности, что значительно ограничивает их применение в медицине и фармации. Ситуацию усугубляет то, что одной из главных проблем профилактики является высокая скорость изменчивости вируса гриппа А вследствие быстро протекающих мутаций (например, мутация в гене М2 белка) [2], это приводит к увеличению устойчивости вируса гриппа А к препаратам, а значит и к снижению активности лекарств, по этой причине требуется замена лекарства.

В связи с вышеизложенным разработка новых безопасных и эффективных в отношении вируса гриппа лекарственных препаратов является одной из приоритетных задач медицины и фармации.

Лекарственные растения и препараты на их основе используются человечеством для лечения различных заболеваний ещё с незапамятных времён. Тем не менее, для лечения ОРВИ растения обычно применяются в симптоматической и патогенетической терапии в качестве жаропонижающих, потогонных, отхаркивающих, противовоспалительных средств [3].

Следует отметить, что существуют и препараты растительного происхождения этиотропного действия. Одним из таких препаратов является противовирусное средство гипорамин, получаемое из листьев *Hipporhae rhamnoides* L. семейства Elaeagnaceae, представляющее собой сухой очищенный стандартизованный экстракт на основе полифенольного комплекса галлоэллаготаннинов [4]. Гипорамин обладает выраженной противовирусной активностью в отношении различных штаммов вируса гриппа человека. В основе механизма действия гипорамин лежит ингибирующий эффект на вирусную нейраминидазу. Однако для гипорамин в литературе не описана противовирусная активность в отношении пандемических штаммов вируса гриппа человека субтипа H1N1pdm09, а также в отношении высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц субтипа H5N1 с пандемическим потенциалом, спо-

собных инфицировать людей и вызывать тяжёлые заболевания с летальным исходом.

В народной медицине лишайники используются для лечения многих заболеваний. Известно, что лишайниковые кислоты (в том числе усниновая кислота) проявляют антибиотические, противопаразитарные и противоопухолевые свойства [5]. Усниновая кислота, полученная из лишайника *Cladonia stellaris*, обладает способностью к подавлению репликации штамма вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)v в культуре клеток MDCK. Эффективность усниновой кислоты и её производных в отношении данного штамма вируса гриппа превышала таковую у рибавирина [6].

Химически синтезированные производные усниновой кислоты показывали активность в отношении штаммов вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/California/7/09 (H1N1)v, A/mallard/Pensilvania/10218/84 (H5N2), A/Владивосток/2/09 (H1N1). Однако противовирусная активность производных усниновой кислоты была всё же ниже, чем препаратов сравнения (римантадин и озельтамивир), за исключением штаммов, устойчивых к ним [5].

При этом для усниновой кислоты и её производного не доказана противовирусная активность в отношении штаммов вируса гриппа других субтипов, включая высокопатогенные штаммы вируса гриппа птиц субтипа H5N1, способные инфицировать людей и вызывать у них тяжёлые заболевания с летальным исходом.

Цель исследования — получение, тестирование химического состава и противовирусной активности в отношении вируса гриппа А экспериментальных образцов препаратов лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach. из семейства Parmeliaceae.

Материал и методы

Словеница лишайника *Cetraria islandica* собраны в Алтайском крае летом 2012 г.

Для подготовки экспериментальных образцов препаратов в виде сухих экстрактов использовали разработанную нами ранее технологию [7]. Этанольные экстракты получали четырёхкратной экстракцией 70% этиловым спиртом при температуре 60°C и соотношении сырья к экстрагенту 1:50. Общее время экстракции составляло 4 часа. Водные экстракты получали двукратной экстракцией дистиллированной водой при температуре 95°C в течение 2 ч (общее время). Соотношение сырья к экстрагенту составляло 1:50. Охлаждённые извлечения отделяли от сырья фильтрованием через стеклянный фильтр (размер пор 10–16 мкм), объединяли, упаривали и досушивали в сушильном шкафу при температуре 60°C до влажности 5%.

Анализ содержания катехинов в экспериментальных образцах препаратов *Cetraria islandica* проводили спектрофотометрическим методом, основанном на способности давать малиновое окрашивание с 1% раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны (λ) 504 нм. Пересчётный коэффициент рассчитан по d-катехину [8]. Флавонолы определяли спектрофотометрическим методом по Беликову [9]. Количество их рассчитывали

по графику, построенному по рутину. Содержание танинов определяли титрометрически по Левенталю [10]. Сапонины осаждали из упаренного спиртового экстракта семикратным объёмом ацетона. Количественное содержание белка в образцах определяли по Бредфорду [11]. Суммарное содержание полисахаридов определяли спектрофотометрически модифицированным антроновым методом Дрейвуда [12], включающим кислотный гидролиз полисахаридов серной кислотой с получением моносахаридов, образующих с антроном окрашенные комплексы сине-зелёного цвета с максимумом спектра поглощения при 520–625 нм. При разбавлении реакционной смеси этиловым спиртом максимум спектра поглощения смещается до 430 нм. Определение содержания полисахаридов проводили в пересчёте на глюкозу, используя предварительно построенный калибровочный график зависимости величины оптической плотности глюкозы (при $\lambda=430$ нм) от концентрации [7].

Для тестирования токсичности и противовирусной активности экстрактов использовали перевиваемую культуру клеток MDCK, полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. По 100 мкл суспензии клеток MDCK в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки крови плодов коровы, вносили в 96-луночные планшеты. Планшеты с клетками помещали в термостат при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 2–3 сут до образования клеточного монослоя.

Для определения токсических концентраций образцы экстрактов разводили в несколько раз и оценивали наличие токсического действия на монослой культуры клеток MDCK с помощью инвертированного микроскопа. Для этого образцы экстрактов растворяли в среде RPMI-1640, делая разведения образцов в 5, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 раз средой, вносили по 100 мкл в соответствующие лунки планшета и ставили в термостат при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 2 сут. Через 2 сут с помощью инвертированного микроскопа оценивали наличие токсического действия на монослой клеток MDCK, инкубированных с разными концентрациями экстрактов лишайника. В опытах по определению противовирусной активности экстрактов в культуре клеток MDCK использовали предварительно определённые их максимально переносимые концентрации (МПК) для этой клеточной культуры, которые составляли 1,0 и 0,1 мкг/мл для водного и этанольного экстракта, соответственно.

В работе использовали штамм вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и штамм вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (п. Кольцово, Новосибирская обл.). Нароботку вируса гриппа производили в 10-суточных куриных эмбрионах (КЭ), концентрацию вируса каждого субтипа определяли путём титрования в культуре клеток MDCK: в каждую лунку вносили 50 мкл питательной среды RPMI-1640 без сыворотки и 50 мкл вирусаллантоисной жидкости (ВАЖ) (по 4 лунки на каждое разведение образца). Титры вируса рассчитывали методом Спирмена–Кербера, выражали в десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в 1 мл ($\lg$ ТЦД₅₀/мл) и представляли в виде $M \pm I_{95}$ (где M — среднее значение, I_{95} — 95% доверительный интервал) [13]. Титры используемых в экспериментах штаммов вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) составляли $6,3 \pm 0,57$ и $7,55 \pm 0,75$ $\lg$ ТЦД₅₀/мл, соответственно.

Для определения противовирусной активности образцов на монослой культуры клеток MDCK вносили по 50 мкл каждого образца экстракта, разведённого поддерживающей средой RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина, до концентрации равной МПК и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в термостате TC-1/80 СПУ (Россия). Затем в лунки с препаратом добавляли по 50 мкл ВАЖ, которую готовили путём разведения ВАЖ каждого вируса от 1 до 8 с десятикратным шагом с использованием поддерживающей

среды RPMI-1640 (ООО «Биолот», Россия) без сыворотки, содержащей 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma, США). Клетки инкубировали 2 сут при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 2 сут в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали цитопатическое действие в монослое клеток и определяли наличие вируса в среде культивирования по реакции гемагглютинации (РГА) с 1% суспензией эритроцитов кур. Титры вируса выражали в $\lg$ ТЦД₅₀/мл в контроле и в опыте и сравнивали по t -критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. Вирусингибирующее действие исследуемых экстрактов оценивали по снижению титра вируса в опыте по сравнению с титром вируса в контроле, для этого высчитывали индекс нейтрализации (ИН) вирусов под влиянием экстракта: $ИН = \frac{\text{Титр}_{\text{контроль}} - \text{Титр}_{\text{опыт}}}{\text{Титр}_{\text{контроль}}} (\lg)$ [8].

В качестве контроля использовали:

1. Контроль клеток MDCK, культивируемых в питательной среде RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma, США), без внесения исследуемых образцов экстрактов и штаммов вируса гриппа А.

2. Контроль репродукции штаммов вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) с 1 до 8 разведения с десятикратным шагом без внесения экстрактов.

В следующей серии экспериментов нами было проведено сравнительное изучение противогриппозных свойств экстрактов *Cetraria islandica* при введении их в профилактической и лечебной схемах. В данных экспериментах в клеточную культуру вносили растительные образцы в МПК, а также референс-препараты (Тамифлю и Римантадин в конечных концентрациях 50 и 10 мкг/мл, соответственно) по 50 мкл/лунку за 24 ч до (профилактическая схема) и через 24 ч после (лечебная схема) инфицирования клеток десятикратными разведениями (с 1 до 8) ВГ в объёме 50 мкл/лунку. В качестве контроля использовали инфицированный монослой клеток, в который вносили питательную среду вместо экстрактов в те же временные точки, что и в опыте. Через 48 ч после инфицирования определяли наличие вируса в среде культивирования в опыте (с образцом) и контроле (без образца) по РГА с 1% эритроцитами кур, после чего рассчитывали и сравнивали титры вируса в $\lg$ ТЦД₅₀/мл в опыте и в контроле по методу Спирмена–Кербера [13].

В дальнейшем нами было проведено изучение механизма действия экстрактов *Cetraria islandica* на вирус гриппа А, для этого нами был исследован вирусингибирующий эффект данных экстрактов в зависимости от времени введения их в инфицированную культуру клеток, а именно: за 1 ч до и через 1, 3, 6 ч после заражения клеток MDCK вирусом гриппа штаммов A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Для этого образцы в МПК и референс-препараты (Тамифлю и Римантадин в конечных концентрациях 50 и 10 мкг/мл, соответственно) по 50 мкл/лунку вносили в клеточную культуру за 1 ч до, а также через 1, 3, 6 ч после инфицирования клеток десятикратными разведениями (с 1 до 8) ВГ, внесёнными по 50 мкл/лунку. Экстракты *Cetraria islandica* и вирусосодержащей жидкости были приготовлены на среде RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина. В качестве контроля использовали инфицированный монослой клеток, в который вносили питательную среду вместо экстрактов в те же временные точки, что и в опыте. Наличие или отсутствие вируса в среде культивирования в опыте и контроле определяли после инкубации заражённых клеток при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 сут после инфицирования по РГА [14]. Титры вируса выражали в $\lg$ ТЦД₅₀/мл в контроле и в опыте и сравнивали по методу Спирмена–Кербера [13].

Результаты и обсуждение

По разработанной и апробированной технологии [7] получены экспериментальные образцы препаратов из сырья лишайника *Cetraria islandica*

Таблица 1. Содержание групп биологически активных веществ в экстрактах *Cetraria islandica*
Table 1. Groups of biologically active substances in extracts of *Cetraria islandica*

Наименование группы БАВ	Содержание групп БАВ, мг/г, $M \pm Sm$; $n=3$	
	Водный экстракт	Этанольный экстракт
Полисахариды	39,7±4,0	131,0±13,0*
Белки	4,1±0,4	11,4±1,1*
Катехины	1,1±0,1*	0,7±0,1
Флавонолы	35,5±3,5*	6,6±0,7
Танины	70,0±7,0*	26,5±1,5
Сапонины	69,0±7,0	563,5±56,5*

Примечание. БАВ — биологически активные вещества; M — среднее арифметическое; Sm — стандартное отклонение; n — число опытов; * — достоверное отличие большего значения от соответствующего показателя в водном и этанольном экстрактах по t -критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Note. БАВ — biologically active substances; M — arithmetic mean; Sm — standard deviation; n — the number of experiments; * — a significant difference of a higher value from the corresponding indicator in aqueous and ethanol extracts according to Student's t -test at $P \leq 0.05$.

Таблица 2. Противовирусная активность экстрактов лишайника в отношении вируса гриппа в монослое клеток MDCK

Table 2. Antiviral activity of lichen extracts against influenza virus in the monolayer of MDCK cells

Образец	Максимально переносимая концентрация для клеток MDCK, мг/мл	Титр инфекционной активности вируса гриппа lg ТЦД ₅₀ /мл (M±I ₉₅), n=3	Индекс нейтрализации (Титр _{контроль} – Титр _{опыт}), lg
A/Aichi/2/68 (H3N2)			
Водный экстракт	1,0	5,3±0,57*	1,00
Этанольный экстракт	0,1	4,3±0,57*	2,00
Контроль вируса	—	6,3±0,57	—
A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)			
Водный экстракт	1,0	6,05±0,49*	1,50
Этанольный экстракт	0,1	5,05±0,49*	2,50
Контроль вируса	—	7,55±0,75	—

Примечание. * — отличие от соответствующего контроля по t -критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; I_{95} — верительный интервал; n — число повторов экспериментов.

Note. * — difference from the corresponding control according to the Student's t -test at $P \leq 0.05$; I_{95} — confidence interval; n — the number of experiment repetitions.

в виде сухих этанольного и водного экстрактов. В образцах определяли содержание биологически активных веществ. Результаты определения химических характеристик образцов приведены в табл. 1. Как видно из табл. 1, этанольный экстракт лишайника по сравнению с водным экстрактом содержит сахаров больше в 3,3 раза, белков больше в 2,8 раза, сапонинов больше в 8,2 раза, в то время как катехинов меньше в 1,6 раза, флавонолов меньше в 5,4 раза и танинов меньше в 2,6 раза.

Далее в культуре клеток MDCK тестировали токсические свойства и противовирусную активность образцов *Cetraria islandica* в отношении вируса гриппа А.

В экспериментах по определению токсических свойств экстрактов было определено, что максимально переносимые концентрации (МПК) для водного и этанольного экстрактов в культуре клеток MDCK составили 1,0 и 0,1 мг/мл, соответственно. Данные МПК экстрактов использовались в дальнейших экспериментах.

Исследование ингибирования репродукции вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и ви-

руса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) экстрактами лишайника по профилактической схеме в монослое клеток MDCK показало, что водный экстракт лишайника проявил незначительный противовирусный эффект в отношении данных вирусов (табл. 2). Индексы нейтрализации для штаммов вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) под действием водного экстракта в концентрации 1,0 мг/мл составили 1,0 и 1,5 lg, соответственно. В то же время индексы нейтрализации штаммов A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) под действием этанольного экстракта составили 2,0 и 2,5, соответственно (см. табл. 2).

Этанольный экстракт, проявивший по сравнению с водным экстрактом более выраженный противогриппозный эффект при более низкой концентрации — 0,1 мг/мл, содержал 11,4 мг/г суммарных белков и 131,0 мг/г суммарных сахаров (см. табл. 1). Более значительная противовирусная активность экстракта из этанольного извлечения лишайника по сравнению с таковым из водного извлечения может быть связана с большим содержанием суммарных

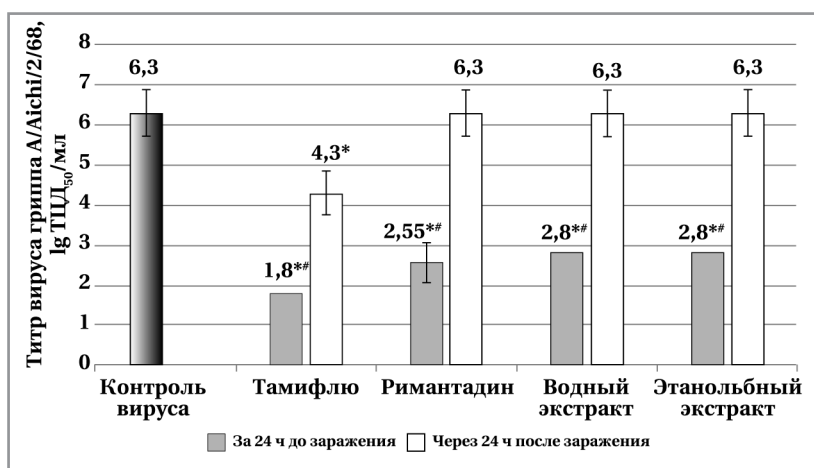


Рис. 1. Титры вируса гриппа штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) в контроле (без экстракта) и в присутствии экстрактов *Cetraria islandica* (опыт) до или после инфицирования культуры клеток MDCK.

Fig. 1. Titers of influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) strain in the control (without the extract) and in the presence of extracts of *Cetraria islandica* (experiment) before or after the infection of MDCK cell culture.

Примечание. Здесь и на рис. 2–4: * — достоверное отличие при $p \leq 0,05$ от соответствующего контроля (без экстракта) рассчитаны по методу Спирмена–Кербера; # — достоверное отличие титров вируса при внесении экстрактов и препаратов сравнения за 24 ч и через 24 ч после заражения, при $p \leq 0,05$ рассчитаны по методу Спирмена–Кербера.

Note. Here and Fig. 2–4: * — a significant difference at $P \leq 0.05$ from the corresponding control (without the extract) calculated by the Spearman–Karber method; # — a significant difference in the value of virus titers when applying extracts of *Cetraria islandica* and comparison drugs 24 hours before and 24 hours after the infection, with $P \leq 0.05$ calculated by the Spearman–Karber method; — 24 hours before the infection; — 24 hours after the infection.

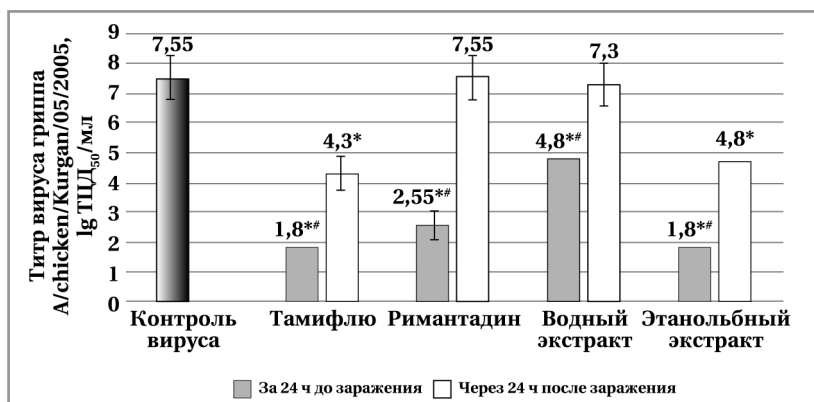


Рис. 2. Титры вируса гриппа штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в контроле (без экстракта) и в присутствии экстрактов *Cetraria islandica* (опыт) до или после инфицирования культуры клеток MDCK.

Fig. 2. Titers of influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) strain in the control (without the extract) and in the presence of extracts of *Cetraria islandica* (experiment) before or after the infection of MDCK cell culture.

белков (в 2,8 раза), сахаров (в 33 раза) и сапонинов (в 8,2 раза). Кроме того, следует предполагать, что этанольный экстракт содержит также и усниновую кислоту, обладающую противогриппозной активностью, поскольку в этиловом спирте она растворяется лучше, чем в воде [15].

В дальнейших исследованиях мы сравнили в профилактической и лечебной схемах эффективность экстрактов лишайника с известными противогриппозными препаратами Римантадином и Тамифлю. Известно, что механизм действия Римантадина основан на способности угнетать раннюю стадию специфической репродукции от проникновения вируса в клетку до начальной транскрипции РНК [16], а механизм действия Тамифлю основан на блокировке активности фермента нейраминидазы, что приводит к прерыванию процесса новообразования вирусов в инфицированных клетках и возможности их проникновения через мембраны здоровых клеток [17].

Оценка противовирусной активности экстрактов лишайника с использованием профилактической (за 24 ч до инфицирования) и лечебной (через 24 ч после инфицирования) схем их внесения на клеточный монослой показала, что достоверное снижение титров вируса гриппа А(Н5N1) и А(Н3N2) происходило при использовании профилактической схемы введения экспериментальных образцов и препаратов сравнения (рис. 1, 2). Индексы подавления продукции вируса гриппа человека А(Н3N2) в профилактической схеме составили для водного, этанольного экстрактов, Тамифлю и Римантадина 3,5; 3,5; 4,5 и 3,75 lg, соответственно, в то время как при лечебной схеме введения образцов индексы подавления вирусной продукции для водного, этанольного экстрактов, Тамифлю и Римантадина были 0,0; 0,0; 2,0 и 0,0 lg, соответственно (см. рис. 1). В отношении вируса гриппа птиц А(Н5N1) все исследуемые образцы и препараты сравнения (Тамифлю и Римантадин) также были более активными при профилактической схеме их введения по сравнению с лечебной схемой. Индексы подавления продук-

ции данного вируса в профилактической схеме составили для водного, этанольного экстрактов, Тамифлю и Римантадина 2,75; 5,75; 5,75 и 5,00 lg, соответственно. При использовании лечебной схемы введения образцов индексы подавления продукции данного вируса были значительно

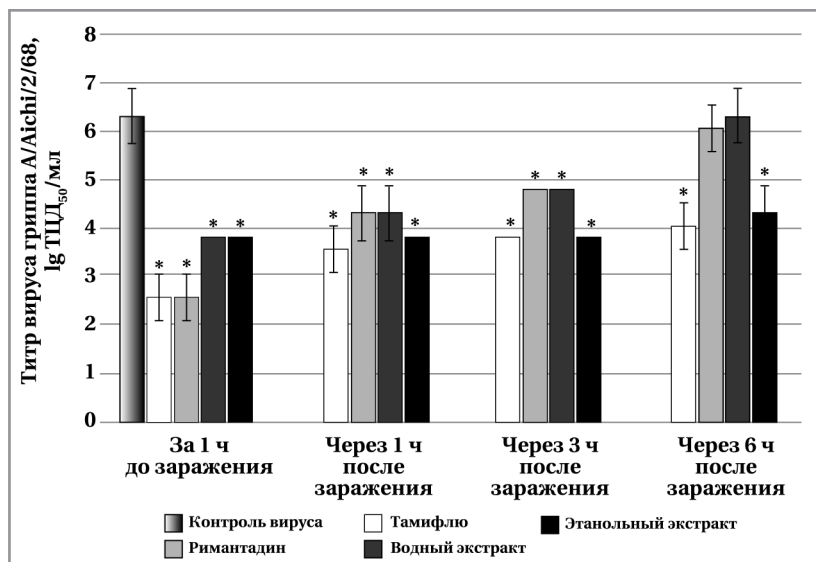


Рис. 3. Титры вируса гриппа штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) в контроле (без экстракта) и в присутствии экстрактов *Cetraria islandica* (опыт) до или после инфицирования культуры клеток MDCK.

Fig. 3. The titers of influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) strain in the control (without the extract) and in the presence of extracts of *Cetraria islandica* (experiment) before or after the infection of MDCK cell culture.

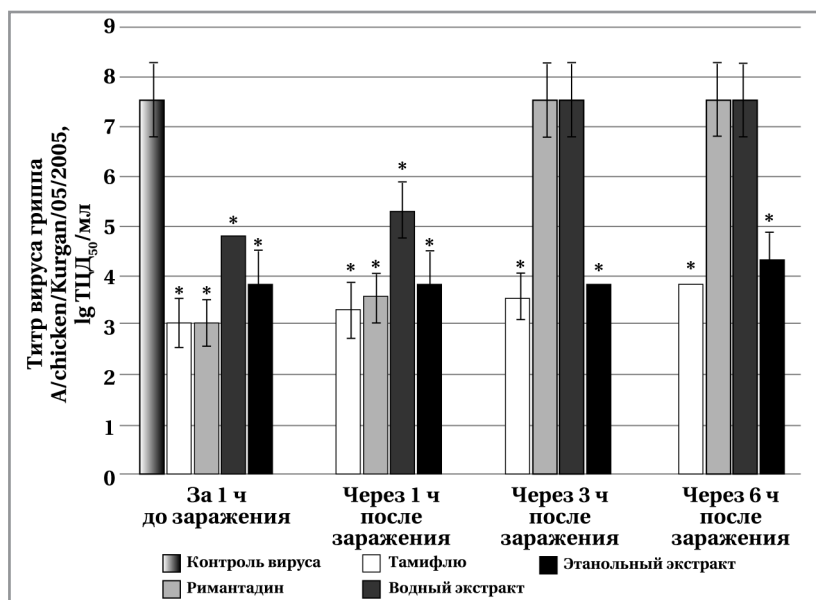


Рис. 4. Титры вируса гриппа штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в контроле (без экстракта) и в присутствии экстрактов *Cetraria islandica* (опыт) до или после инфицирования культуры клеток MDCK.

Fig. 4. Titters of influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) strain in control (without the extract) and in the presence of extracts of *Cetraria islandica* (experiment) before or after the infection of MDCK cell culture.

ниже по сравнению с таковыми в профилактической схеме и составили для водного, этанольного экстрактов, Тамифлю и Римантадина 0,25; 2,75; 3,25 и 0,0 lg, соответственно (см. рис. 2).

В экспериментах по изучению влияния экстрактов *Cetraria islandica* на титры вируса гриппа в культуре клеток MDCK в зависимости от вре-

мени их внесения (до и после заражения) нами было выявлено, что этанольный экстракт снижает инфекционность вируса гриппа человека A(H3N2) и птиц A(H5N1) как при его внесении за 1 ч до, так и через 1, 3 и 6 ч после заражения вирусом гриппа (рис. 3, 4). В то время как водный экстракт снижает инфекционность вируса гриппа человека A(H3N2) в культуре клеток MDCK за 1 ч до, и через 1, 3 ч после заражения данным штаммом (см. рис. 3), а вируса гриппа птиц A(H5N1) — за 1 ч до, и через 1 ч после заражения этим штаммом (см. рис. 4).

Из полученных данных (рис. 3, 4) видно, что этанольный экстракт лишайника *Cetraria islandica* влияет на репродукцию вируса гриппа в течение такого же периода времени (6 ч), что и референс-препарат Тамифлю, что позволяет указывать на схожесть механизма действия этих препаратов. В то время как водный экстракт влияет только на стадии адсорбции и ранние стадии вирусного цикла использованных штаммов вируса гриппа А в культуре клеток MDCK, что даёт нам возможность предположить, что механизм действия данного экстракта сравним с механизмом действия используемого в эксперименте второго референс-препарата Римантадина.

Таким образом, экспериментальные образцы препаратов в виде водного и этанольного экстрактов лишайника *Cetraria islandica* имеют высокую противовирусную активность, которая проявляется в том, что они ингибируют репродукцию вируса гриппа в культуре клеток MDCK. Следует отметить, что этанольный экстракт показал более высокую эффективность по сравнению с водным экстрактом.

Исходя из этого, можно сделать вывод о высоком потенциале этанольного экстракта, полученного

из лишайника *Cetraria islandica*, для использования его в качестве основы для новых высокоэффективных лекарственных препаратов для профилактики и лечения гриппа.

Работа выполнена в рамках государственного задания №30/21 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Отсутствие конфликта интересов.

Участие авторов. Е. В. Макаревич — выполнение методик, получение данных для анализа, интерпретация результатов, написание текста, редактирование; М. А. Проценко — вы-

полнение методик, написание текста; редактирование; О. Ю. Мазурков — выполнение методик; Е. И. Филиппова — получение данных для анализа; Н. А. Мазуркова — постановка проблемы, анализ и интерпретация результатов, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&id=11308&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>.
2. Watts J. Asian nations step up action to curb spread of avian influenza. *Lancet*. 2004; 363 (9406): 373. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15475-5.
3. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: Учебник. — М.: Медицина; 2022. [Murav'eva D.A., Samylina I.A., Yakovlev G.P. Farmakognoziya: Uchebnik. Moscow: Meditsina; 2022. (in Russian)]
4. Вичканова С.А. Изучение листьев облепихи и создание на их основе отечественного противовирусного средства «Гипорамин». V Международный съезд «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения»; 2001; Санкт-Петербург. [Vichkanova S.A. Izuchenie list'ev oblepikhi i sozdanie na ikh osnove otechestvennogo protivovirusnogo sredstva «Giporamin». (Conference proceedings) V Mezhdunarodnyi sezd «Aktual'nye problemy sozdaniya novykh lekarstvennykh preparatov prirodnogo proiskhozhdeniya»; 2001; Sankt-Peterburg. (in Russian)].
5. Штро А.А. Исследование активности производных усниновой кислоты в отношении вируса гриппа: дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург; 2014. [Shtro A.A. Issledovanie aktivnosti proizvodnykh usninovoi kisloty v otnoshenii virusa grippa. [dissertation]. Sankt-Peterburg; 2014. (in Russian)].
6. Патент РФ на изобретение № 2464033/ 20.10.2012. Бюл. №29. Соколов Д.Н., Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Киселев О.И., Зарубаев В.В., Штро А.А. Усниновая кислота и ее окисленное производное в качестве ингибиторов репродукции вируса гриппа [Patent RUS №2464033/ 20.10.2012. Byul. №29. Sokolov D.N., Luzina O.A., Polovinka M.P., Salakhutdinov N.F., Kiselev O.I., Zarubae V.V., Shtro A.A. Usninovaya kislota i ee okislennoe proizvodnoe v kachestve ingibitorov reproduksii virusa grippa. (in Russian)]
7. Проценко М.А. Разработка технологии экспериментальных образцов препаратов из высших базидиомитетов: дис. ... канд. биол. наук. Кольцово; 2016. [Protsenko M.A. Razrabotka tekhnologii eksperimental'nykh obraztsov preparatov iz vysshikh bazidiomitsetov. [dissertation] Kol'tsovo; 2016. (in Russian)]
8. Кукушкина Т.А., Зыков А.А., Обухова Л.А. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) как источник лекарственных средств. Материалы УП Международного Съезда Фитофарм 2003. «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». СПб.: Пушкин, 03–05 июля 2003; 64–69. [Kukushkina T.A., Zykov A.A., Obukhova L.A. Manzheta obyknovennaya (*Alchemilla vulgaris* L.) kak istochnik lekarstvennykh sredstv. Materialy UP Mezhdunarodnogo S'ezda Fitofarm 2003. «Aktual'nye problemy sozdaniya novykh lekarstvennykh preparatov prirodnogo proiskhozhdeniya». SPb.: Pushkin, 03–05 iyyulya 2003; 64–69. (in Russian)]
9. Проценко М.А., Мазуркова Н.А., Филиппова Е.И., Кукушкина Т.А., Лобанова И.Е., Пшеничкина Ю.А., Высочина Г.И. Противогриппозная активность экстрактов растений семейства Lamiaceae. Химия растительного сырья. 2021; 2: 181–190. doi: <https://doi.org/10.14258/jcprm.2021028744>. [Protsenko M.A., Mazurkova N.A., Filippova E.I., Kukushkina T.A., Lobanova I.E., Pshenichkina Yu.A., Vysochina G.I. Anti-influenza activity of plant extracts of the Lamiaceae family. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja*. 2021; 2: 181–190. doi: <https://doi.org/10.14258/jcprm.2021028744>. (in Russian)]
10. Государственная фармакопея Российской Федерации: Вып. 4, 14-е изд. М.: Медицина, 2018; 3262. [Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federatsii: Vyp. 4, 14-e izd. Moscow: Meditsina, 2018; 3262. (in Russian)]
11. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–254.
12. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Модификация антронового метода количественного определения углеводов и его применение для анализа растительного сырья, содержащего полисахариды. Бюллетень сибирской медицины. 2006; 2: 118–119. [Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. Modifikatsiya antronovogo metoda kolichestvennogo opredeleniya uglevodov i ego primenenie dlya analiza rastitel'nogo syr'ya, soderzhashchego polisakharidy. *Bjulleten' Sibirskoj Meditsiny*. 2006; 2: 118–119. (in Russian)]
13. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976. [Zaks L. Statistical evaluation. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)]
14. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Р. У. Хабриев (ред.). М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005; 832. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. R. U. Khabriev (ed.). Moscow: OAO «Izdatel'stvo «Meditsina», 2005; 832.
15. Sokolov D.N., Luzina O.A., Salakhutdinov N.F. Usnic acid: preparation, structure, properties and chemical transformations. *Russian Chemical Reviews*. 2012; 81 (8): 747–768. doi: <https://doi.org/10.1070/RC2012v081n08ABEH004245>.
16. Tsunoda A., Maassab H.F., Cochran K.W., Eveland W.C. Antiviral activity of alpha-methyl-1-adamantanemethylamine hydrochloride. *Antimicrob Agents Chemother* (Bethesda). 1965; 5: 553–60. doi: 10.1128/AAC.5.6.553.
17. Jefferson T., Jones M.A., Doshi P., Del Mar C.B., Hama R., Thompson M.J. et al. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 4: CD008965.

Информация об авторах

Макаревич Елена Викторовна — научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5146-8979

Проценко Мария Анатольевна — к. б. н., старший научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1995-7588

Мазурков Олег Юрьевич — к. б. н., научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Госу-

About the authors

Elena V. Makarevich — researcher at the Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0002-5146-8979

Mariya A. Protsenko — Ph. D. in Biology, Senior researcher, Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0002-1995-7588

Oleg Yu. Mazurkov — Ph. D. in Biology, Researcher, Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnol-

дарственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8164-4091
Филиппова Екатерина Игоревна — к. б. н., научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9554-4462
Мазуркова Наталья Алексеевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1896-2684

ogy VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0001-8164-4091
Ekaterina I. Filippova — Ph. D. in Biology, Researcher, Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0001-9554-4462
Natalia A. Mazurkova — D. Sc. in Biology, Leading researcher, Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0002-1896-2684.

Изучение молекулярных параметров и антибактериальная активность пептидного препарата, полученного из лейкоцитов человека

*А. Г. ВОЛКОВ¹, Л. И. КОНОНОВА², В. П. КОРОБОВ^{2,3}, Л. В. ВОЛКОВА³

¹ ФГБОУ ВПО Пермский медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера, Пермь, Россия

² «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

³ ФГБОУ ВПО Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Study of Molecular Parameters and Antibacterial Activity of a Peptide Preparation Derived from Human Leukocytes

*ALEXANDER G. VOLKOV¹, LYUDMILA I. KONONOVA²,
VLADIMIR P. KOROBV^{2,3}, LARISA V. VOLKOVA³

¹ Perm State Medical University named after Academician E. A. Wagner, Perm, Russia

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

³ Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

Резюме

Актуальность. Изучение выделяемых из тканей живых организмов новых антимикробных субстанций имеет особое значение для медицины и биофармацевтической промышленности. В этой связи лейкоцитарные пептиды могут рассматриваться в качестве альтернативы традиционным антибиотикам для преодоления проблемы бактериальной антибиотикорезистентности. **Цель исследования.** Оценка молекулярной массы и биологической активности, полученных с помощью ультразвука лейкоцитарных пептидов. **Методы исследования.** Разделение лейкоцитарных пептидных комплексов на отдельные фракции методом обращённо-фазовой хроматографии и оценка их антибактериальной активности методами серийных разведений и диффузионным. **Результаты.** Исследованиями выявлено, что пептидная фракция с молекулярной массой 440–570 Да обладает выраженной антибактериальной активностью. **Выводы.** Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о высоком лечебном потенциале лейкоцитарного белково-пептидного комплекса, обладающего широким спектром антибактериальной активности.

Ключевые слова: лейкоцитарные пептиды человека; антибактериальная активность; обращённо-фазовая хроматография.

Для цитирования: Волков А. Г., Кононова Л. И., Коробов В. П., Волкова Л. В. Изучение молекулярных параметров и антибактериальная активность пептидного препарата, полученного из лейкоцитов человека. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68 (9–10): 20–24. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-20-24>.

Abstract

Background. The study of new antimicrobial substances isolated from the living organism tissues is of particular importance for medicine and the biopharmaceutical industry. Leukocyte peptides can act as an alternative to traditional antibiotics to overcome the bacterial antibiotic resistance problem. **Aim.** Evaluation of molecular weight and biological activity of ultrasound-derived leukocyte peptides. **Methods.** Separation of leukocyte peptide complexes into particular fractions by reverse phase chromatography and evaluation of their antibacterial activity by serial dilution and diffusion methods. **Results.** Studies have shown that one peptide fraction with a molecular weight of 440–570 Da has pronounced antibacterial activity. **Conclusion.** The obtained experimental data testify to the high therapeutic potential of the leukocyte protein-peptide complex, which has a wide spectrum of antibacterial activity.

Keywords: human leukocyte peptides; antibacterial activity; reversed phase chromatography

For citation: Volkov A. G., Kononova L. I., Korobov V. P., Volkova L. V. Study of molecular parameters and antibacterial activity of a peptide preparation derived from human leukocytes. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 20–24. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-20-24>.

Введение

В настоящее время отмечается стремительное увеличение резистентности бактерий к антимикробным препаратам, значительно затрудняющее лечение инфекционных заболеваний [1, 2]. Учитывая современные представления о необходимости обеспечения качества лекарств и их адаптированности к человеческому организму, наиболее предпочтительными средствами лечения становятся препараты, содержащие естественные компоненты тканей организма с известной биологической активностью [3–6]. Принципиально новым классом природных антибиотиков являются антимикробные пептиды, представляющие собой небольшие молекулы размером до 50 аминокислотных остатков, способные подавлять клетки микроорганизмов. В настоящее время известно большое число пептидных соединений, обладающих высокой антибактериальной активностью, выделенных из клеток крови, барьерного эпителия и других тканей человека и животных [7–12].

Для получения таких пептидов из лейкоцитарных клеток часто используются различные методы: извлечение 10% раствором уксусной кислоты с последующим разрушением клеточных элементов на холоде; экстракция 0,02 М Na-ацетатным буфером, содержащим 0,3% цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ); использование 0,3% раствора бромистого цетилтриметиламмония в 0,02 М натрий-ацетатном буфере при pH 4,5; получение аффинолейкина гемолизом вирусиндуцированных лейкоцитов при многократном воздействии низких температур [13, 14].

В технологии получения пептидов используются не только химические, но и физические методы, в частности, гомогенизация лейкоцитарных клеток в системе «стекло–тефлон» с последующей экстракцией при температуре 4–5°C, а также ультразвуковая кавитация суспендированных в жидкостях клеток с их полным разрушением и применение силового поля [15]. Особенно эффективным для разрушения клеток оказалось использование низкочастотного ультразвука [16, 17]. Регулируя варианты ультразвукового воздействия — меняя его частоту, мощность, продолжительность и состав используемой среды показана возможность получения конечных продуктов с новыми свойствами [18]. Следует отметить, что пептидные соединения, получаемые из лейкоцитов, индуцированных ультразвуком, могут проявлять разнообразную биологическую активность и быть основой разработки новых фармацевтических средств.

Фракционирование и очистка биологически активных пептидов лейкоцитарного лизата является весьма сложной задачей в связи с присутствием в этом материале высокомолекулярных белков крови [19]. Обнаружено, что пробоподго-

товка препаратов для жидкостной хроматографии, включая освобождение аналита от высокомолекулярных матричных белков с помощью градиентного центрифугирования, осаждения органическими растворителями (этанол, ацетон) [20] и адсорбции на различных сорбентах, приводит к потере низкомолекулярных пептидов, находящихся в используемом лейкоцитарном лизате в незначительной концентрации.

Необходимо также отметить, что гель-проникающая хроматография в режиме низкого давления при использовании сефадексов, являющаяся наиболее распространённым методом очистки аналита от высокомолекулярных белков, также приводит к значительным потерям низкомолекулярных пептидов [20].

Цель исследования — оценка спектра молекулярных масс и антибактериальной активности лейкоцитарных пептидов человека, полученных с помощью ультразвука, которые в настоящий момент изучены недостаточно.

Материал и методы

Материалом для исследования служили лиофилизированные препараты лейкоцитарного пептидного комплекса, полученные после воздействия *in vitro* ультразвука на лейкоциты доноров [21].

Оценку молекулярной массы пептидных компонентов в выделенных препаратах проводили MALDI-масс-спектрометрическим анализом.

В качестве объектов исследования использовали бактерии *Staphylococcus epidermidis* 33 GISK, *Staphylococcus epidermidis* 33 GISK Vanr [22], *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, а также *Bacillus subtilis*, выделенные с поверхности кожи человека. Бактерии культивировали в колбах на среде LB (г/л: триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 6,4) с перемешиванием на орбитальном шейкере при 150 об/мин и температуре 37°C. Динамику роста бактериальных культур отслеживали по изменению их оптической плотности при 600 нм, используя спектрофотометр PD-303 («APEL», Япония) и кюветы с длиной оптического пути 1 см.

Анализ антибактериальной активности лейкоцитарного пептидного комплекса проводили диффузионным методом в соответствии с рекомендациями [23] на агаризованной питательной среде LB. После нанесения бактерий на поверхность питательного агара, на его различные зоны наносили по 10 мкл исходного раствора лейкоцитарного препарата и его разведений. Затем чашки инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Результаты экспериментов оценивали путём измерения диаметров зон подавления роста тест-бактерий.

Определение относительной антибактериальной активности препарата лейкоцитарных пептидов против бактерий *S.epidermidis* 33 GISK проводили методом серийных разведений в бульоне (г/л: триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5), используя полистироловые иммунологические планшеты («Медполимер», Россия), согласно рекомендациям [23].

Разделение пептидов лейкоцитарного комплекса и выявление среди них активных фракций в отношении бактерий *S.epidermidis* 33 GISK проводили, используя систему Äktapurifier («GE Healthcare», Швеция) с колонкой μ RPC C2/C18 ST 4.6/100 в градиенте концентраций 0–70% ацетонитрила («Криохром», Россия) в 0,1% трифторуксусной кислоте («Fluka», США) со скоростью элюирования 1 мл/мин. Детекцию индивидуальных пептидов проводили при длине волны 214 нм.

Диаметры зон подавления роста бактерий (мм)
Diameters of bacterial growth inhibition zones (mm)

<i>S.epidermidis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Bacillus</i> spp.	<i>E.coli</i>
35	35	31	29

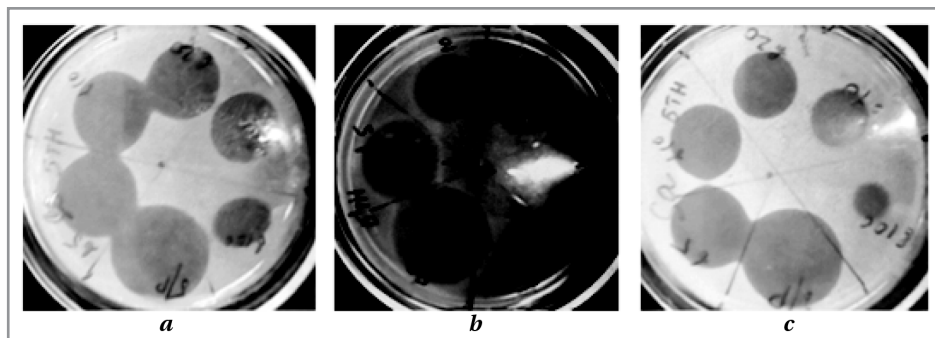


Рис. 1. Антибактериальная активность лейкоцитарного пептидного комплекса, полученного под действием ультразвука в отношении:

a — *S.epidermidis* 33 GISK; b — *S.epidermidis* 33 GISK Vanr; c — *S.aureus* ATCC 25923.

Рис. 1. Antibacterial activity of the leukocyte peptide complex obtained under the influence of ultrasound in relation to:

a — *S.epidermidis* 33 GISK; b — *S.epidermidis* 33 GISK Vanr; c — *S.aureus* ATCC 25923.

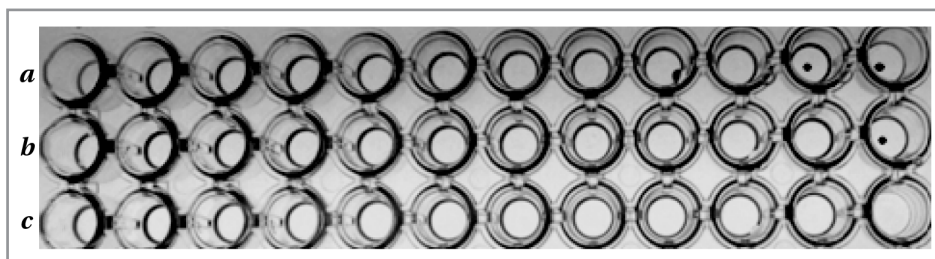


Рис. 2. Активность лейкоцитарного пептидного комплекса, полученного под действием ультразвука, против *S.epidermidis* 33 GISK при различных кратностях разведения:

a — 1:9; b — 1:4; c — без разведения.

Fig. 2. Activity of the leukocyte peptide complex obtained using ultrasound against *S.epidermidis* 33 GISK at various dilutions:

a — 1:9; b — 1:4; c — without dilution.

Результаты и обсуждение

Оценка биологических свойств пептидного комплекса, а именно его антибактериальной активности, показала, что препарат практически в одинаковой степени подавляет рост бактерий рода *Staphylococcus* (рис. 1). В то же время его действие, ингибирующее рост бактерий *E.coli* и *Bacillus* spp., оказалось менее выраженным, что характеризовалось меньшими диаметрами зон отсутствия роста этих микроорганизмов (таблица).

Методом серийных разведений в бульоне установлено, что исходный препарат обладает активностью против бактерий штамма *S.epidermidis* 33 GISK, большей, чем 4096 ЕА/мл, разведённый в 5 раз — равной 2048, а в 10 раз — 1024 ЕА/мл (рис. 2).

Разделение лиофилизированного пептидного комплекса на отдельные фракции обращённо-фазовой хроматографией на установке Äktapurifier, позволило выявить его компоненты, обладающие

антибактериальной активностью, которая обнаруживалась только в одной фракции и элюировалась с колонки до поступления на неё ацетонитрила (рис. 3). Пик адсорбции при 214 нм соответствовал содержащему фракции № 2, и только в ней обнаруживалась антибактериальная активность (на рис. 3 указано стрелкой).

Результаты анализа спектра молекулярных масс лиофилизированного препарата лейкоцитов, обработанных ультразвуком, показали, что полученный препарат состоит из пептидов с молекулярной массой от 440 до 3000 дальтон (Да) и представляет собой комплекс из 15 основных пептидов. Пептиды с молекулярной массой более 3000 Да не выявлялись (рис. 4).

Было также установлено, что компоненты комплекса, обладающие антимикробной активностью, выделенные на хроматографической установке Äk-

tapurifier, обнаруживаются в диапазоне масс от 440 до 570 Да (рис. 5), и являются, по-видимому, небольшими пептидами, состоящими из 3–5 аминокислотных остатков.

Исследования, представленные в данной статье, показали, что новый полипептидный комплекс, полученный из лейкоцитов крови человека с использованием ультразвуковых волн, оказывает одинаковое воздействие на бактерии разных видов рода *Staphylococcus*, при этом на рост бактерий *E.coli* и *Bacillus* spp. антибактериальная активность выражена значительно слабее.

Использование обращённо-фазовой высокоэффективной хроматографии показало наличие в смеси пептидов отдельной фракции с молекулярной массой 440–570 Да, обладающей антибактериальной активностью. Можно предположить, что это небольшие пептиды из 3–5 аминокислотных остатков.

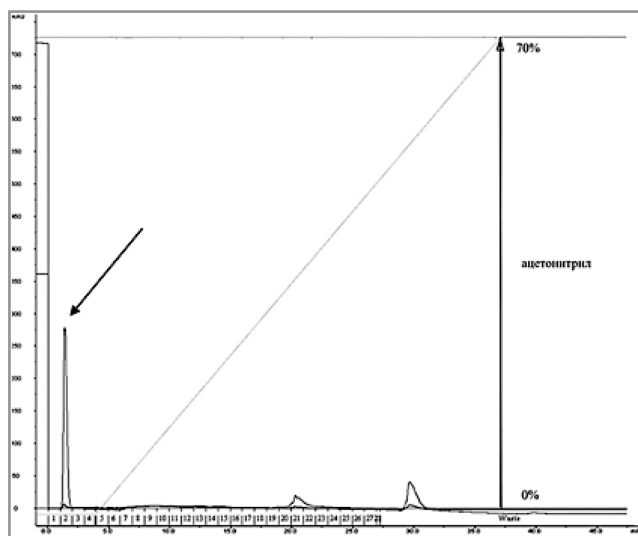


Рис. 3. Обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография лейкоцитарного пептидного комплекса, полученного под действием ультразвука. Примечание. Объяснения — в тексте.

Fig. 3. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of a leukocyte peptide complex obtained using ultrasound.

Note. Explanations are in the text.

Практическое применение полученных результатов позволит в перспективе создать комплексные препараты с синтетическими модификаторами и как следствие снизить экономические затраты [24–26].

Заключение

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о широком спектре антибактериальной активности лейкоцитарного пептидного комплекса, модифицированного ультразвуком, что представляет несомненный практический интерес.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов при подготовке данной статьи.

Участие авторов. А. Г. Волков — разработка технологии получения нового лейкоцитарного пептидного комплекса, предоставление опытного образца в достаточном количестве для постановки

Литература/References

1. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дефензины — мультифункциональные катионные пептиды человека. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008; 2: 31. [Budihina A.S., Pinegin B.V. Defenziny — multifunctional'nye kationnye peptidy cheloveka. Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya. 2008; 2: 31. (in Russian)]
2. Baltzer S.A., Brown M.H. Antimicrobial peptides — promising alternatives to conventional antibiotics. J Mol Microbiol Biotechnol. 2011; 20 (4): 228–235. doi: 10.1159/000331009.
3. Навашин С.М., Сазыкин Ю.О. Антибиотики: новые механизмы передачи резистентности. Антибиотики и химиотер. 1998; 6: 3–6. [Na-

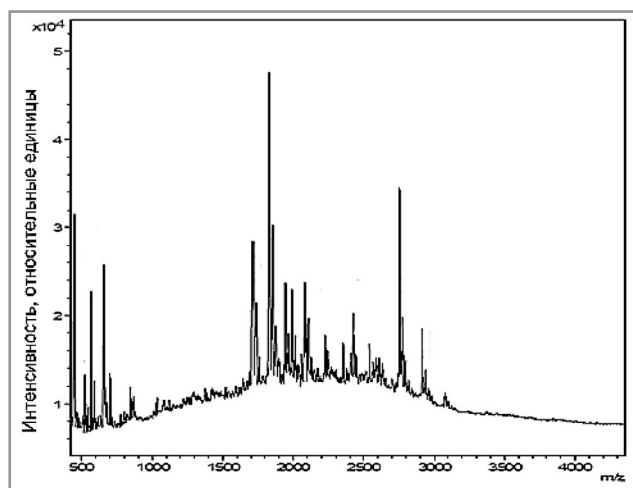


Рис. 4. Масс-спектр лейкоцитарного препарата, полученного с использованием ультразвука.

Fig. 4. Mass spectrum of a leukocyte preparation obtained using ultrasound.

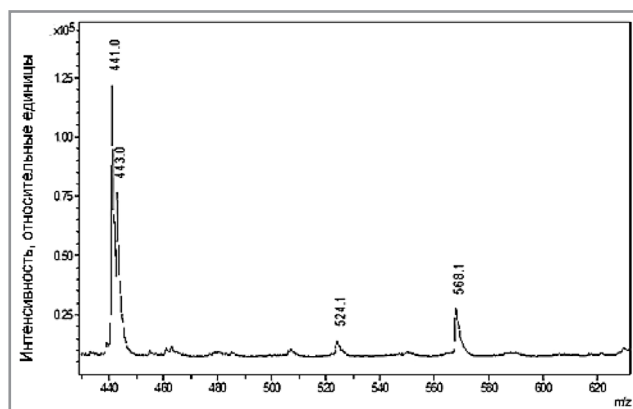


Рис. 5. Масс-спектр активной фракции лейкоцитарного препарата, полученного с использованием ультразвука.

Fig. 5. Mass spectrum of the active fraction of a leukocyte preparation obtained using ultrasound.

экспериментов, интерпретация результатов, написание текста; Л. И. Кононова — постановка экспериментов, представленных в статье, написание резюме; В. П. Коробов — контроль за постановкой экспериментов, редактирование статьи; Л. В. Волкова — разработка технологии получения нового лейкоцитарного пептидного комплекса, редактирование, финальное утверждение рукописи.

vashin S.M., Sazykin Yu.O. Antibiotiki: novye mekhanizmy peredachi rezistentnosti. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 1998; 6: 3–6. (in Russian)]

4. Тапальский Д.В., Мозгова А.В., Козлова А.И. Эффективность комбинаций антибиотиков в отношении карбапенемрезистентных госпитальных изолятов *Acinetobacter baumannii*. Клиническая инфектология и паразитология. Спецвыпуск в Беларуси. 2014; 95–103. [Tapal'skij D.V., Mozgova A.V., Kozlova A.I. Effektivnost' kombinacij antibiotikov v otnoshenii karbapenemrezistentnyh hospital'nyh izolyatov *Acinetobacter baumannii*. Klinicheskaya Infektologiya i Parazitologiya. Specvypusk v Belarusi 2014; 95–103. (in Russian)]

5. Шагинян И.А., Дмитриенко О.А. Молекулярная эпидемиология инфекций, вызываемых метициллиноустойчивыми стафилококками. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2003; 3: 99–109. [Shaginyan I.A., Dmitrienko O.A. Molekulyarnaya epidemiologiya infekcij, vyzyvayemyh metitsillinostojchivymi stafilokokkami. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii. 2003; 3: 99–109. (in Russian)]
6. Alalwani S.M., Sierigk J., Herr Ch., Pinkenburg O., Gallo R., Vogelmeier C., Bals R. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. Eur J Immunol. 2010; 40 (4): 1118–1126. doi: 10.1002/ ej.200939275.
7. Hoskin D.W., Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes. 2008; 1778: 357–375.
8. Pulido D., Torrent M., Andreu D., Nogués M.V., Boix E. Two human host defense ribonucleases against mycobacteria, the eosinophil cationic protein (RNase 3) and RNase 7. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57: 3797–3805. doi: 10.1128/AAC.00428-13.
9. Chan D.I., Prenner E.J., Vogel H.J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. Biochim Biophys Acta. 2006; 1758 (9): 1184–1202. doi: 10.1016/j.bbame. 2006.04.006.
10. Lim H.S., Chun S.M., Soung M.G., Kim J., Kim S.J. Antimicrobial efficacy of granulysin-derived synthetic peptides in acne vulgaris. Int J Dermatol. 2015; 54 (7): 853–862. doi: 10.1111/ijd.12756.
11. Мусин Х.Г. Антимикробные пептиды — потенциальная замена традиционных антибиотикам. Инфекция и иммунитет. 2018; 3: 295–308. [Musin H.G. Antimikrobnye peptidy — potencial' naya zamena tradicionnym antibiotikam. Infekciya i Immunitet. 2018; 3: 295–308. (in Russian)]
12. Жаркова М.С., Орлов Д.С., Кокряков В.Н., Шамова О.В. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения. Вестник СПбГУ. сер. 3. Вып. 1. 2014; 98–114. [Zharkova M.S., Orlov D.S., Kokryakov V.N., Shamova O.V. Antimikrobnye peptidy mlekopitayushchih: klassifikatsiya, biologicheskaya rol', perspektivy prakticheskogo primeneniya. Vestnik SPbGu. 2014; 3: 1: 98–114. (in Russian)]
13. Патент РФ на изобретение № 2076715./1991. Мац А.Н., Перепечкина Н.П., Воейкова Е.С., Райхер Л.И. и др. Способ получения препарата «Аффинолейкин» для противoinфекционной иммунотерапии. [Patent RUS № 2076715./1991. Mac A.N., Perepechkin N.P., Voejkova E.S., Rajher L.I. i dr. Sposob polucheniya preparata «Affinolejkin» dlya protivoinfekcionnoj immunoterapii. (in Russian)]
14. Мац А.Н., Боков М.Н., Кузьмина М.Н. Концепция низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов и её новые практические приложения. Аллергология и иммунология. 2008; 4: 444–447. [Mats A. N., Bokov M.N., Kuz'mina M.N. Konceptsiya nizkomolekulyarnyh antigenspecifichnyh citokinov i eyo novye prakticheskie prilozheniya. Allergologiya i Immunologiya. 2008; 4: 444–447. (in Russian)]
15. Bennett W.F., Hong C.K., Wang Y., Tieleman D.P. Antimicrobial peptide simulations and the influence of force field on the free energy for pore formation in lipid bilayers. J Chem. Theory Comput. 2016; 12 (9): 4524–4533. doi: 10.1021/acs.jctc.6b00265.
16. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами. Под ред. С. Шукина. М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. [Osnovy vzai-
- modejstviya ul'trazvuka s biologicheskimi ob'ektami. S. Shchukin (ed.). Moscow: MG TU im. N.E. Bauman; 2005. (in Russian)]
17. Аюбян В.Б., Ершов Ю.А., Шукин С.И. Ультразвук в медицине, ветеринарии и биологии: учебное пособие для бакалавриата и магистратуры. Под ред. С. И. Шукина. М.: Юрайт, 2017; 223с. [Ayubyan V.B., Ershov YU.A., Shchukin S.I. Ul'trazvuk v medicine, veterinarii i biologii: uchebnoe posobie dlya bakalavriata i magistratury. S. I. Shchukina (ed.). Moscow: YUrajt. 2017; 223. (in Russian)]
18. Волкова Л.В., Гришина Т.А., Волков А.Г. Фракционный состав лейкоцитарного лизата и его биологические свойства. Современные проблемы науки и образования. 2019; 1. http://science-education.ru/ru/article/view?id=28527 [Volkova L.V., Grishina T.A., Volkov A.G. Frakcionnyj sostav lejkocitarnogo lizata i ego biologicheskie svoystva. Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya. 2019; 1. http://science-education.ru/ru/article/view?id=28527 (in Russian)]
19. Ибрагимов А.Н., Бикмүллин А.Г., Сатаева Д.А. и др. Хроматографические методы очистки белков. Казань. 2013; 48. [Ibragimov A.N., Bikmullin A.G., Sataeva D.A. et al. Hromatograficheskie metody ochildki belkov. Kazan. 2013; 48. (in Russian)]
20. Журлов О.С. Фракционирование антимикробных пептидов тромбоцитарного лизата (HPL). Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований 2016; 3: 247–250. [Zhurlov O.S. Frakcionirovanie antimikrobnyh peptidov trombocitarnogo lizata (HPL). Mezhdunarodnyj Zhurnal Prikladnyh i Fundamental'nyh Issledovaniy. 2016; 3: 247–250. (in Russian)]
21. Патент РФ на изобретение № 2737730/ 2019 г. Волкова Л.В., Гришина Т.А., Волков А.Г. Способ фракционирования лейкоцитарных белков. [Patent RUS № 2737730/ 2019. Volkova L.V., Grishina T.A., Volkov A.G. Sposob frakcionirovaniya lejkocitarnykh belkov. (in Russian)]
22. Кононова Л.И., Коробов В.П. Физиологические особенности устойчивого к ванкомицину штамма *Staphylococcus epidermidis* 33 GISK VANR. Микробиология. 2015; 84 (1): 58–67. doi: https://doi.org/10.1134/S0026261715010063. [Kononova L.I., Korobov V.P. Physiological properties of the vancomycin-resistant strain *Staphylococcus epidermidis* 33 GISK VANR. Microbiology (Mikrobiologiya). 2015; 84 (1): 41–48. doi: https://doi.org/10.1134/S0026261715010063. (in Russian)]
23. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г., Лукин И.Н., Грудина С.А. Практические аспекты современной клинической микробиологии. Тверь: ООО «Издательство «Триада». 2004; 312. [Skala L.Z., Sidorenko S.V., Nekhorosheva A.G., Lukin I.N., Grudinina S.A. Prakticheskie aspekty sovremennoj klinicheskoy mikrobiologii. Tver': OOO «Izdatel'stvo «Triada». 2004; 312. (in Russian)]
24. Guaní-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S. O., Terán L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. Clin Immunol. 2010; 135: 1: 1–11. doi: 10.1016/j.clim. 2009.12.004.
25. Nguyen L. T., Haney E, Silva O. N., Mulder K. C. L., Barbosa A. E. A. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. Front Microbiol. 2011; 2: 232. URL: http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb.2011.00232/full
26. Held-Kuznetsov V., Rotem S., Assaraf Y. G., Mor A. Host-defense peptide mimicry for novel antitumor agents. FASEB J. 2009; 23: 12: 4299–4307.

Информация об авторах

Волков Александр Геннадьевич — к. м. н., старший преподаватель кафедры фармакологии ФГБОУ ВПО Пермский медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера, Пермь, Россия

Кононова Людмила Ивановна — ведущий инженер лаборатории биохимии развития микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН, Пермь, Россия

Коробов Владимир Павлович — к. м. н., доцент кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета; зав. лабораторией биохимии развития микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН, Пермь, Россия

Волкова Лариса Владимировна — д. м. н., профессор кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета, Пермь, Россия

About the authors

Alexander G. Volkov — Ph. D. in Medicine, senior lecturer at the Department of Pharmacology, Perm State Medical University named after Academician E. A. Wagner, Perm, Russia

Lyudmila I. Kononova — leading engineer of the Laboratory of Biochemistry of Microorganism Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Vladimir P. Korobov — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University; Head of the Laboratory of Biochemistry of Microorganism Development, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Larisa V. Volkova — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониевых фенотипов у *Staphylococcus aureus*

*В. В. ГОСТЕВ^{1,2}, О. С. КАЛИНОГОРСКАЯ¹, О. С. СУЛЯН¹,
П. С. ЧУЛКОВА¹, Ю. В. СОПОВА^{3,4}, М. Е. ВЕЛИЖАНИНА^{3,5},
В. Ю. ПЛЕШКОВ^{1,6}, В. А. АГЕЕВЕЦ¹, С. В. СИДОРЕНКО^{1,2}

¹ ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

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

⁴ Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

⁶ ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

The Effect of Shock Gentamicin Concentrations on the Formation of Resistance and Small Colony Variants in *Staphylococcus aureus*

*VLADIMIR V. GOSTEV^{1,2}, OLGA S. KALINOGORSKAYA¹, OFELIA S. SULIAN¹,
POLINA S. CHULKOVA¹, JULIA V. SOPOVA^{3,4}, MARIA E. VELIZHANINA^{3,5},
VYACHESLAV Y. PLESHKOV^{1,6}, VLADIMIR A. AGEEVETS¹, SERGEY V. SIDORENKO^{1,2}

¹ Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

² North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

³ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

⁴ St. Petersburg branch of the Vavilov Institute of General Genetics, Saint-Petersburg, Russia

⁵ All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

⁶ St. Petersburg Research Institute of Emergency Medicine named after I. I. Dzhanelidze, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Гентамицин является одним из компонентов комбинированной терапии инфекционных эндокардитов, вызванных *Staphylococcus aureus*, включая метициллинорезистентные штаммы (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA). Цель исследования — анализ влияния десяти 6-часовых циклов воздействия высоких концентраций (16 мкг/мл) гентамицина *in vitro* на изменение фенотипа и генотипа аминогликозидочувствительных штаммов *S. aureus*, относящихся к четырём сиквенс-типам: ST5 (ATCC 29213), ST8, ST97 и ST22 (MRSA). Для всех штаммов, кроме ATCC 29213, после селекции отмечалось увеличение МПК гентамицина до 8–64 мкг/мл. Один штамм (SA0937) диссоциировал на три морфотипа, включая мелкоколониевый вариант (small colony variant, SCV). Вариант производного штамма SA0937 с колониями нормального размера характеризовался ассоциированной устойчивостью к даптомицину за счёт мутации P314L в MprF. Формирование устойчивости не сопровождалось изменением скорости роста, кроме морфотипа SCV. Для штамма ATCC 29213 после селекции отмечалось появление толерантности, проявляющейся в увеличении эффективного киллинга до 14 ч в 24-часовом time-killing эксперименте с концентрацией антибиотика 16 мкг/мл. У штамма ATCC 29213 выявлены мутации в пептидил т-РНК гидролазе (Pth). У трёх штаммов были обнаружены делеции в гене *atpG*, входящим в состав АТФ-синтазного комплекса. У остальных производных штаммов были выявлены делеции и мутации в генах метаболизма менахинона *herS*, *menA* и трансляционном факторе элонгации G (*fusA*). Таким образом, использование гентамицина сопряжено с возможным быстрым формированием устойчивости и толерантности, не связанными с приобретением генов аминогликозид-модифицирующих ферментов. Выявление SCV ассоциировано с неблагоприятными клиническими исходами. При использовании комбинированной терапии необходимо учитывать, что существует возможность формирования устойчивости к даптомицину на фоне селекции гентамицином.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*; гентамицин; устойчивость; селекция; мелкоколониевые варианты; мутации; биосинтез менахинона

Для цитирования: Гостев В. В., Калиногорская О. С., Сулян О. С., Чулкова П. С., Сопова Ю. В., Велижанина М. Е., Плешков В. Ю., Агеевец В. А., Сидоренко С. В. Влияние шоковых концентраций гентамицина на формирование устойчивости и мелкоколониевых фенотипов у *Staphylococcus aureus*. Антибиотики и химиотер. 2023; 68 (9–10): 25–33. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-25-33>.

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Профессора Попова, д. 9, ДНКЦИБ, г. Санкт-Петербург, Россия, 197022.
E-mail: guestvv11@gmail.com

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 9 Prof. Popova st., Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint-Petersburg, 197022 Russia. E-mail: guestvv11@gmail.com

Abstract

Gentamicin is one of the components of combination therapy for infective endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The purpose of this study was to analyze the effect of ten 6-hour cycles of exposure to high concentrations (16 µg/ml) of gentamicin *in vitro* on the phenotype and genotype changes of aminoglycoside-susceptible *S. aureus* strains belonging to four sequence types (ST): ST5 (ATCC 29213), ST8, ST97, and ST22 (MRSA). After selection, an increase in the MIC of gentamicin to 8–64 µg/ml for all strains except ATCC 29213 was observed. One strain (SA0937) dissociated into three morphotypes, including a small colony variant (SCV). A derivative strain SA0937 variant with normal colony size was characterized by associated resistance to daptomycin due to the P314L mutation in MprF. Except for the SCV morphotype, there was no change in growth rate in response to the formation of resistance. After selection, the emergence of the ATCC 29213 strain tolerance was noted. It manifested by an increase in effective killing up to 14 hours in a 24-hour time-killing test with 16 µg/ml of antibiotic concentration. It was revealed that the ATCC 29213 strain has mutations in peptidyl-tRNA hydrolase (Pth). Deletions in the *atpG* gene, which is part of the ATP synthase complex, were found in three strains. Deletions and mutations in the menaquinone metabolism genes *hepS*, *menA*, and translation elongation factor G (*fusA*) were identified in the remaining derivative strains. Thus, the use of gentamicin is linked to possible rapid development of resistance and tolerance, which is not associated with the acquisition of aminoglycoside-modifying enzyme genes. Detection of SCV is associated with adverse clinical outcomes. It is important to consider the possibility of developing resistance to daptomycin due to gentamicin selection when using combination therapy.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; gentamicin; resistance; selection; small colony variants; mutations; menaquinone biosynthesis

For citation: Gostev V. V., Kalinogorskaya O. S., Sulian O. S., Chulkova P. S., Sopova Y. V., Velizhanina M. E., Pleshkov V. Y., Ageevets V. A., Sidorenko S. V. The effect of shock gentamicin concentrations on the formation of resistance and small colony variants in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 25–33. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-25-33>.

Введение

Аминогликозидные антибиотики являются препаратами широкого спектра действия и характеризуются выраженным бактерицидным действием в отношении *Staphylococcus aureus*, включая метициллинорезистентные штаммы (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), опосредуя необратимое нарушение биосинтеза белка [1]. Аминогликозиды проникают в клетку через цитоплазматическую мембрану за счёт протон-движущей силы с затратой энергии в виде молекул АТФ. Устойчивость к аминогликозидам обусловлена несколькими механизмами. Наиболее распространённый из них — это наличие аминогликозид-модифицирующих ферментов, которые распространяются достаточно быстро, путём горизонтального переноса генов. Другие механизмы, такие как мутации в рибосомальных РНК и изменение работы электрон-транспортной цепи, дыхательного и энергетического метаболизма [2], путём накопления мутаций в соответствующих генах, встречаются реже.

Одна из особенностей, описанная у *S. aureus*, это образование особого морфотипа — мелкоколониевых вариантов (Small Colony Variants, SCV), ассоциированных с устойчивостью к гентамицину. SCV фенотипы представляют собой очень мелкие колонии, часто без пигментации, с крайне низкой и линейной скоростью роста. Это связано с появлением ауксотрофности по некоторым кофакторам. Так, зависимость роста от наличия гема, менадиона, менахинона ассоциирована с воздействием гентамицина [3]; зависимость от тимидина ассоциирована с воздействием триметоприма-сульфаметоксазола [4]. Выделяют также и CO₂-зависимые фенотипы SCV [5]. Делеции и

мутации в ключевых генах биосинтеза кофакторов (Men, Hem, ThyA) являются основной причиной появления ауксотрофности. Выявление SCV фенотипов ассоциировано с неблагоприятными клиническими исходами [5]. Несмотря на высокую частоту встречаемости устойчивости к аминогликозидам среди *S. aureus*, гентамицин является одной из альтернатив для терапии тяжёлых инфекций, в частности в комбинированной терапии инфекционных эндокардитов [6, 7].

Для гентамицина, как и для других аминогликозидов, характерен концентрационно-зависимый киллинг, что обосновывает однократное введение всей суточной дозы, приводящее к относительно кратковременному воздействию на микроорганизмы высоких концентраций антибиотика [8]. Целью настоящего исследования стал анализ влияния циклического воздействия высоких концентраций гентамицина *in vitro* на изменение фенотипа и генотипа аминогликозидочувствительных штаммов *S. aureus*. Данный подход был впервые применён при воздействии ампициллина на *Escherichia coli* [9], когда авторам удалось получить производные изоляты с неизменным уровнем чувствительности, но проявляющие признаки толерантности. В настоящее время этот метод широко используется в экспериментальных работах для других сочетаний микроб-антибиотик.

Материал и методы

Бактериальные изоляты. В работу были включены три клинических изолята *S. aureus* из коллекции бактериальных культур ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, а также штамм ATCC 29213, сиквенс-типа — ST5. Клинические изоляты включали SA0707 (ST8, MSSA), SA0937 (ST97, MSSA) и SA01037 (ST22, MRSA).

Воздействие шоковыми концентрациями гентамицина. За основу эксперимента был взят опыт O. Fridman и со-

авт. [9]. Согласно предложенной схеме, изначально получали ночной инокулом исследуемых изолятов, далее делали разведения клеточной биомассы в соотношении 1:100 в сердечно-мозговом бульоне ВНИ (Brain-heart infusion, Bio-Rad, Франция). При этом оценивали плотность клеточной биомассы с подсчётом КОЕ/мл. После в среду (100 мл) добавляли антибиотик гентамицин (Molekula, Англия) в конечной концентрации 16 мкг/мл, с последующей инкубацией в течение шести часов при 37°C и орбитальном шейкировании 250 об/мин. После шести часов воздействия антибиотиком снова проводили оценку плотности клеточной биомассы с подсчётом КОЕ на плотной питательной среде. Далее весь объём среды и клеток (100 мл) дважды отмывали от антибиотика в PBS-буфере, получали клеточный осадок и ресуспендировали в свежем бульоне ВНИ для получения ночного инокулома. Все вышеописанные манипуляции составляли один цикл селекции. Всего было проведено десять циклов селекции. В каждом цикле была подсчитана доля выживших клеток, исходя из разности значений КОЕ/мл до и после шестичасового воздействия гентамицином.

Оценка чувствительности к антибиотикам. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) определяли методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона (Bio-Rad, Франция) в соответствии со стандартом ISO 20776-1:2019. Интерпретацию результатов проводили согласно EUCAST (версия 13.0, 2023). Для диско-диффузионного метода (ДДМ) использовали диски гентамицина (10 мкг) и амикацина (30 мкг) производства Bio-Rad (Франция). Для градиентного-диффузионного метода (ГДМ) использовали полоски ETEST® (bioMérieux, Франция). Скорость отмирания бактериальных культур (Time-killing) с гентамицином (16 мкг/мл) осуществляли в среде Мюллера–Хинтона со стартовым инокуломом 10^8 – 10^9 КОЕ/мл. Высев культур осуществляли через 3, 6, 9, 14, 18 и 24 ч. За MDK (minimal duration of killing) принимали время, необходимое

для киллинга 99,99% клеток (КОЕ/мл), что соответствовало снижению КОЕ/мл на ~3–4 логарифма.

Оценка скорости роста. Относительную скорость роста (r , мин⁻¹), время удвоения клеток (мин), ЛАГ-фазу (мин) оценивали путём измерения оптической плотности (OD600), используя планшетный ридер-шейкер инкубатор Infinite 200 Pro (Tecan, Австрия) в 96-луночном плоскодонном планшете в объёме 100 мкл среды ВНИ. Считывание OD600 проводили каждые 10 мин в течение 14 ч. Анализ кривых роста проводили с помощью R пакета Growthcurver [10].

Полногеномное секвенирование. Геномную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen™, Германия) с предварительным лизисом клеток в буфере, содержащем 5 мг/мл лизостафина (Sigma-Aldrich, США) и 50 мг/мл лизоцима (Amresco, США). Для подготовки ДНК-библиотек использовался набор DNA Prep (Illumina, Сан-Диего, США) в соответствии с протоколом производителя. ДНК-библиотеки секвенировали на приборе MiSeq (Illumina, США) с получением парных ДНК-прочтений длиной 300 п. н. ДНК-прочтения депонированы в публичный депозитарий данных секвенирования NCBI Sequence Read Archive (SRA) под номером BioProject PRJNA996487. Риды контрольных штаммов (до селекции) доступны под номерами SRR14216098, SRR14216103 (BioProject PRJNA721282), SRR11196766 (BioProject PRJNA609231), SRR5100333 (PRJNA325350).

Биоинформатический анализ. Удаление адаптерных последовательностей и фильтрация низкокачественных прочтений проводили с помощью программ FastQC [11] и trimomatic [12]. Геномы контрольных штаммов были собраны *de novo* с использованием SPAdes [13]. Для выявления генетических изменений, риды штаммов после селекции с гентамицином, выравнивали на контиги геномов контрольных штаммов с использованием программы Breseq [14].

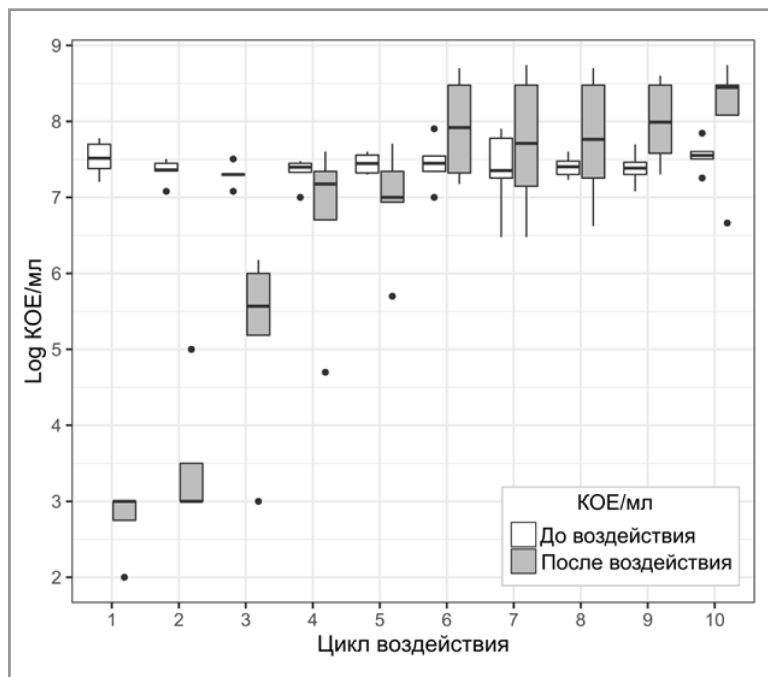


Рис. 1. Влияние шоковых концентраций гентамицина (16 мкг/мл) на чувствительные *S. aureus* в течение 10 циклов воздействия.

Примечание. Представлено соотношение клеток (КОЕ/мл) до и после каждого цикла воздействия (медиана и межквартильный интервал).

Fig. 1. Effect of shock concentrations of gentamicin (16 µg/ml) on sensitive *S. aureus* during 10 cycles of exposure.

Note. Cell ratio (CFU/ml) before and after each exposure cycle (median and interquartile range) is presented.

Результаты

Фенотипические изменения. При воздействии шоковыми концентрациями гентамицина стартовое значение инокулома в каждом цикле для каждого штамма составляло 7,4 (7,2–7,5) log КОЕ/мл. При этом в первые три цикла воздействия уровень выживших клеток составлял не более 1%, что соответствовало 4,5 (2,5–5) log КОЕ/мл (рис. 1). Уже к пятому циклу уровень выживших клеток составлял 7,0 (6,6–7,2) log КОЕ/мл; в последующие шестой–десятый циклы подавление роста отсутствовало. После десятого цикла воздействия для штамма SA0937 отмечалась фенотипическая диссоциация, были выявлены колонии трёх типов: мелкие колонии с выраженным жёлтым цветом (рис. 2, A2), очень мелкие прозрачно-беловатые колонии (рис. 2, A3, A4), и колонии нормального размера (рис. 2, A5), не отличающиеся от оригинальных до селекции (рис. 2, A1). У остальных штаммов не было выявлено диссоциации.

Для большинства штаммов после десятого цикла воздействия было выявлено увеличение уровня МПК с 0,25–0,5 мкг/мл до 8–64 мкг/мл к гента-

Фенотипические и генотипические изменения у штаммов после воздействия шоковыми концентрациями гентамицина
Phenotypic and genotypic changes in strains after exposure to shock concentrations of gentamicin

Штаммы	До воздействия						После воздействия						Мутации	
	МПК, мкг/мл			Фен			МПК, мкг/мл			скорость роста				
	GEN	ACN	DAP	Lag	Dt	ОСР	GEN	ACN	DAP	Lag	Dt	ОСР		
ATCC29213	0,5	4	0,5	110	23±0,5	1		1	4	0,5	110	24±1	0,98	Pth (Y79S + G44D) atpG (Δ15 п. н.), SACOL2260 (Δ126 п.н.)
SA0707	0,25	4	0,25	120	30±1	1		8	16	0,25	120	32±1	0,87	
SA0937	0,5	4	0,5	120	24±0,5	1	Y	8	16	0,5	140	28±1	0,90	hepS (Δ13 п. н.) MenA (D205A, Δ21 п. н., L17*) MprF (P314L), atpG (Δ19 п. н.) atpG (Δ15 п.н.), Fusa (G507S)
							SCV	16	32	0,5	—	—	—	
							N	32	64	4	120	25±2	0,95	
SA1037	0,5	4	0,5	120	24±0,5	1		64	64	0,5	120	26±0,5	0,90	

ATCC 29213	0,5	4	0,5	110	23±0,5	1	1	4	0,5	110	24±1	0,98	Pth (Y79S + G44D)
SA0707	0,25	4	0,25	120	30±1	1	8	16	0,25	120	32±1	0,87	atrG (Δ15 п. н.), SACOI2260 (Δ126 п. н.)

SA0937	0,5	4	0,5	120	24±0,5	1	8	16	0,5	140	28±1	0,90	hepS (Δ13 п. н.)
							16	32	0,5	—	—	—	MenA (D205A, Δ21 п. н., L17*)
							32	64	4	120	25±2	0,95	MprF (P314L), atrG (Δ19 п. н.)
SA1037	0,5	4	0,5	120	24±0,5	1	64	64	0,5	120	26±0,5	0,90	atrG (Δ15 п. н.), FusA (C507S)

Примечание. Антибиотики и используемые критерии оценки чувствительности: GEN — гентамицин (S≤2 мкг/мл); ACN — амикацин (S≤16 мкг/мл); DAP — даптомицин (S≤1 мкг/мл). Скорость роста: Lag — ЛАГ-фаза роста (мин); Dt — время удвоения клеток (мин); ОСР — относительная скорость роста. Фен — фенотипическая диссоциация штамма SA0937; Y — колонии жёлтого цвета; SCV — мелкоколониевые варианты (скорость роста не была определена); N — колонии обычного размера. Мутации: Δ — делеции; * — стоп-кодон.

Note. Antibiotics and sensitivity assessment criteria used: GEN — gentamicin (S≤2 µg/ml); ACN — amikacin (S≤16 µg/ml); DAP — daptomycin (S≤1 µg/ml). Growth rate: Lag — lag phase of bacterial growth (min); Dt — cell doubling time (min); ОСР — relative growth rate. Фен — phenotypic dissociation of SA0937 strain; Y — yellow colonies; SCV — small-colony variants (growth rate was not determined); N — normal-sized colonies. Mutations: Δ — deletions; * — stop codon.

мицину и амикацину (таблица). При постановке диско-диффузионного метода (ДДМ), для штаммов с высокими значениями МПК наблюдалась двойная зона роста (рис. 3), при этом диаметр внутренней зоны составлял 11–16 мм для гентамицина и 12–14 мм для амикацина. При постановке ДДМ с колониями из внутренней зоны эффект двойной зоны сохранялся. Штамм ATCC 29213 после селекции сохранял чувствительность к аминогликозидным антибиотикам (см. таблицу).

Для оценки возможного влияния гентамицина на формирование толерантности для штамма ATCC 29213 был проведён «Time-killing» эксперимент, по результатам которого отмечалось увеличение времени эффективного киллинга (MDK_{99,99}). Так, для штамма до воздействия гентамицином, было характерно снижение клеточной плотности с 9,0 до 5,0 log КОЕ/мл за 3 ч; в то время как для штамма после воздействия на такое же снижение клеточной плотности потребовалось 14 ч.

Не было выявлено изменения уровня МПК после воздействия гентамицином при оценке чувствительности к 21 антибиотику других классов, за исключением диссоциированного штамма SA0937, представленного колониями нормального размера. Данный вариант характеризовался устойчивостью к даптомицину (см. таблицу), при этом уровень МПК составлял 4 мкг/мл. На рис. 2, B1–B4 представлено сравнение оценки чувствительности к даптомицину с помощью метода ГДМ для всех вариантов диссоциированного штамма SA0937, колонии нормального размера имели уровень МПК 2 мкг/мл. При оценке скорости роста не было выявлено статистически значимых изменений (см. таблицу) у штаммов после воздействия гентамицином, ЛАГ-фаза роста, время удвоения клеток и относительная скорость роста изменялись не более чем на 13%. Для мелкоколониевых вариантов штамма SA0937 измерить скорость не удалось ввиду очень плохого роста культуры в бульонной среде.

Генотипические изменения. У штаммов после воздействия гентамицином были выявлены различные мутации (см. таблицу). Делеции в гене *atrG*, входящим в состав АТФ-синтазного комплекса, и кодирующего гамма цепь, были обнаружены у трёх штаммов. У штамма ATCC 29213 выявлена мутация в пептидил т-РНК гидролазе (Pth), участвующей в реакции присоединения аминокислот к растущей пептидной цепочке, в процессе трансляции. У жёлтых колоний штамма SA0937 выявлена делеция в гене *hepS*, который кодирует субъединицу фермента гептапренил-дифосфат синтазы, участвующей в метаболизме менахинона, одного из ключевых соединений, которые не могут синтезировать SCV варианты *S. aureus*.

Мелкоколониевые варианты штамма SA0937 характеризовались несколькими мутациями в 1,4-

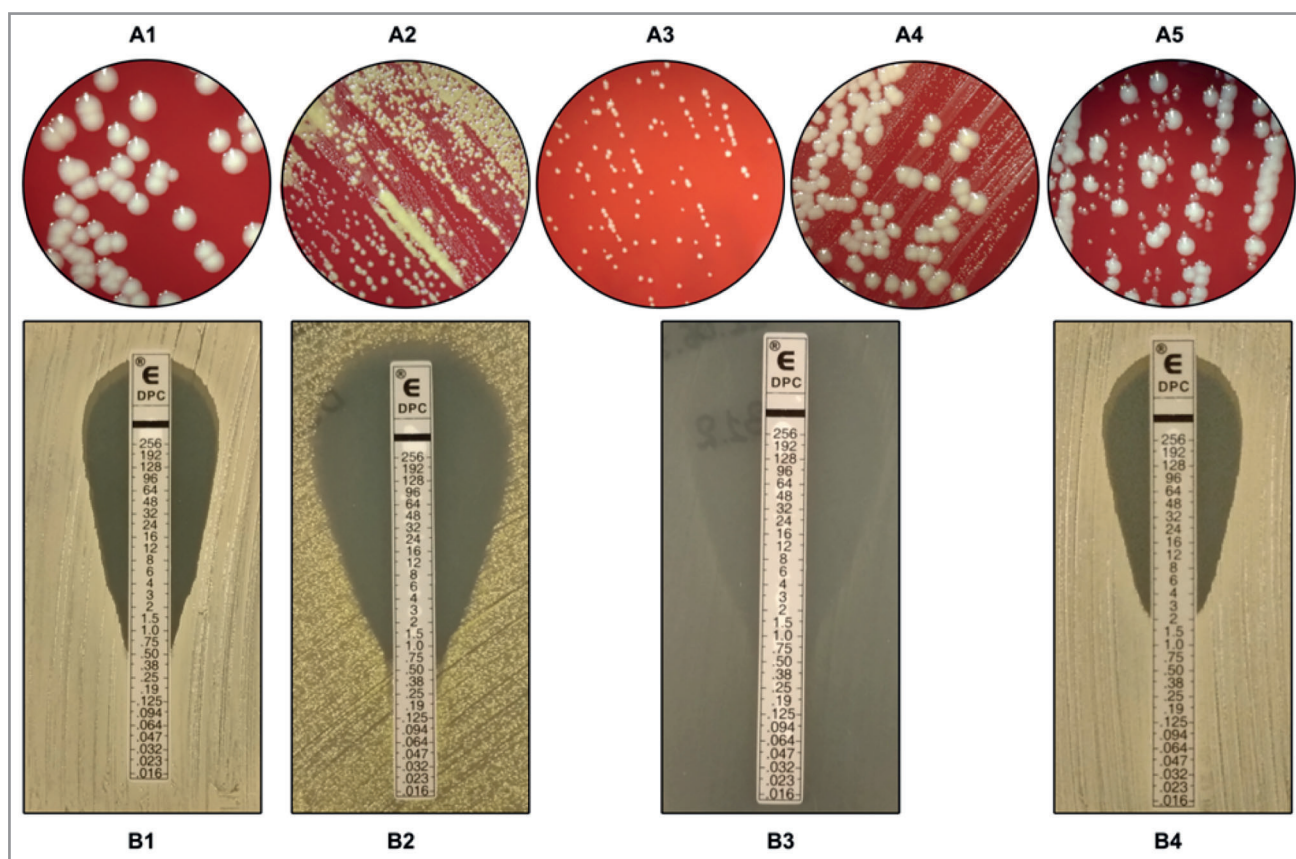


Рис. 2. Фенотипическая диссоциация изолята SA0937 после воздействия гентамицином (А) и оценка устойчивости к даптомицину с помощью градиентных-диффузионных тестов (В).

A1 — штамм до воздействия, типичные колонии *S. aureus* на кровяном агаре; A2 — штамм Y после воздействия, изменение пигментации колоний с выраженным жёлтым цветом; A3 — штамм SCV фенотип; A4 — SCV фенотип в смешанной культуре с колониями нормального размера; A5 — штамм N, представлен колониями нормального и мелкого размера (Ув. $\times 1,25$, стереомикроскоп STEMI 2000-C (ZEISS)).

Примечание. Соответствующие результаты чувствительности к даптомицину, B1–B3 — чувствительные штаммы; B4 — устойчивый штамм.

Fig. 2. Phenotypic dissociation of SA0937 isolate after exposure to gentamicin (A) and assessment of daptomycin resistance using gradient diffusion tests (B).

A1 — strain before exposure, typical colonies of *S. aureus* on blood agar; A2 — strain Y after exposure, change in pigmentation of colonies with a pronounced yellow color; A3 — SCV phenotype strain; A4 — SCV phenotype in a mixed culture with colonies of normal size; A5 — strain N, represented by colonies of normal and small size (magnification $\times 1,25$, Stereomicroscope STEMI 2000-C (ZEISS)).

Note. The corresponding daptomycin sensitivity results, B1–B3 are susceptible strains; B4 is a resistant strain.

диокси-2-нафтоат пренилтрансферазе (MenA), участвующей в биосинтезе менахинона. Вариант с нормальной морфологией колоний штамма SA0937 имел делецию в гене *atpG*, а также аминокислотную замену P314L в лизил-фосфатидил-глицерол синтазе (MprF), ферменте, участвующем в биосинтезе мембранных фосфолипидов. У штамма SA1037 выявлены две мутации: в *aptG* и трансляционном факторе элонгации G (*FusA*). У штамма SA0707, помимо мутации в *aptG*, выявлена делеция в гене, кодирующем гипотетический протеин SACOL2260 (локус в референс-геноме *S. aureus* COL). Локус SACOL2260 (533 п.н.) характеризуется низкой консервативностью и локализован между геном, кодирующим транскрипционный регулятор *SarV* и геном *moaA*, продукт

которого участвует в метаболизме молибдена. У всех штаммов до и после воздействия гентамицином не было выявлено генов, кодирующих аминокликозид-модифицирующие белки.

Обсуждение

В данном исследовании был использован метод кратковременного циклического воздействия высокими концентрациями антибиотика, что позволяет получить толерантность к антибиотикам. Ранее нами, используя эту же экспериментальную модель, при воздействии ванкомицином на MRSA, были получены гетерорезистентные изоляты, где гетерорезистентность была обусловлена формированием мутаций в системе WalKR,

регулирующей биосинтез клеточной стенки [15]. Воздействие аминогликозидов на штаммы *S. aureus* при таком варианте селекции устойчивости *in vitro*, не изучалось. В настоящем исследовании воздействие шоковой концентрацией гентамицином, в 32 раза превышающую уровень МПК у исследуемых штаммов, приводило к появлению разных фенотипов и разных механизмов устойчивости. Необходимо отметить, что выбранная в эксперименте концентрация близка к максимальной сывороточной концентрации (20 мкг/мл) при стандартной дозировке 7 мг/кг. Выбранное время воздействия (6 ч) также близко к пограничной зоне 10–12 ч, при соблюдении условия $AUC > MPK \cdot 2$ мкг/мл [16]. Таким образом, выбранная модель эксперимента частично моделирует фармакокинетику гентамицина.

Прежде всего, следует отметить, что результат воздействия гентамицина на стафилококки во многом зависел от генотипа микроорганизма. Так, при воздействии гентамицина на штамм ST5 (ATCC 29213) не было получено повышения МПК к аминогликозидам, но при этом отмечалось формирование толерантности, проявлявшейся в увеличение периода времени эффективного киллинга. У данного штамма выявлена мутация в гене *pth*, участвующего в процессе трансляции. Ранее было показано, что мутации в данном гене опосредуют универсальную толерантность у *Escherichia coli* к бактерицидным антибиотикам разных групп [17]. Мутации, влияющие на скорость рибосомального биосинтеза белка, по всей видимости, опосредуют формирование антибиотикотолерантности. У штаммов с другими генотипами (ST8, ST97 и ST22) устойчивость формировалась достаточно быстро, и уже к четвёртому-пятому циклу селекции для большинства штаммов отмечался рост в присутствии гентамицина. Формирование устойчивости не сопровождалось изменением скорости роста, что свидетельствует о низком «fitness cost» при формировании устойчивости к аминогликозидам.

В настоящем исследовании после воздействия гентамицином только один производный штамм, характеризующийся очень мелкими колониями и мутациями в гене биосинтеза менахинона (*menA*), обладал истинным фенотипом SCV, при этом высокий уровень устойчивости к аминогликозидам сформировался у подавляющего большинства производных штаммов. Связь влияния аминогли-

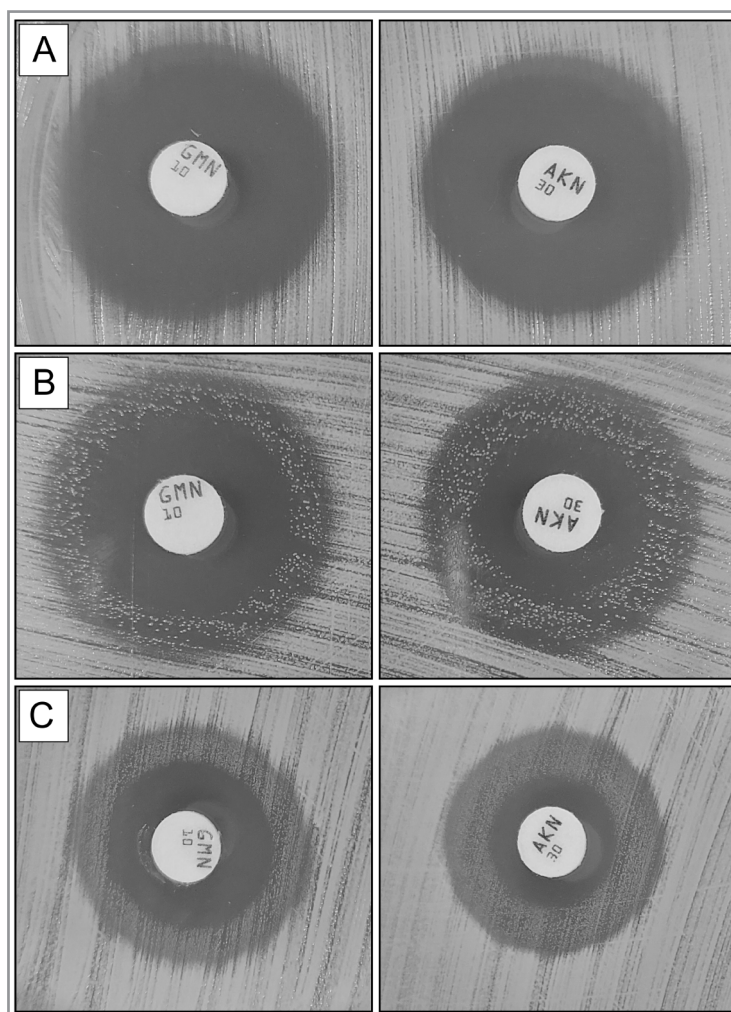


Рис. 3. Пример учёта результатов диско-диффузионного метода определения чувствительности к гентамицину (GMN) и амикацину (AKN).

А — штамм SA1037 до селекции; В — после пятого цикла воздействия гентамицином; С — после десятого цикла.

Fig. 3. An example of recording the results of the disc diffusion method for determining sensitivity to gentamicin (GMN) and amikacin (AKN).

А — SA1037 strain before selection; В — after the fifth cycle of exposure to gentamicin; С — after the tenth cycle.

козидов на формирование мелкоколониевых вариантов достаточно хорошо изучена [18, 19], описаны клинические примеры формирования SCV фенотипов на фоне терапии гентамицином [3]. Устойчивость к аминогликозидам, независимо от наличия генов аминогликозид-модифицирующих ферментов, является одним из свойств мелкоколониевых вариантов. Стоит также отметить, что SCV варианты, сформированные без индукции антибиотиками, также могут характеризоваться устойчивостью к гентамицину [5].

Отличительной фенотипической особенностью всех производных штаммов было формирование двойной зоны роста вокруг диска с антибиотиком при постановке ДДМ. Как правило,

при наличии аминокликозид-модифицирующих ферментов задержка роста при постановке ДДМ имеют одну чёткую зону. Таким образом, обнаружение такого фенотипа среди клинических изолятов, может свидетельствовать о наличии SCV вариантов и альтернативных механизмов устойчивости к аминокликозидам и гетерорезистентности. Большинство штаммов имели делеции в гене *atpG*, кодирующего гамма субъединицу АТФ-синтазного комплекса, участвующего в системе электрон-транспортной цепи. Ранее было показано, что мутации и делеции в этом гене опосредуют формирование устойчивости к гентамицину у *E. coli* [20] и *Listeria monocytogenes* [21]. Ещё одно интересное наблюдение было сделано в экспериментальных работах по направленному мутагенезу генов оперона *atp*. Так, в исследовании M. Vestergaard и соавт. [22] было показано, что делеции в *atp* генах приводят к формированию чувствительности к полимиксинам у *S. aureus*, который характеризуется природной устойчивостью к данной группе препаратов. В исследовании L. Liu и соавт. [23], используя аналогичный экспериментальный подход, выявлено появление высокой чувствительности к противомикробным пептидам человека. Влияние мутаций в генах *atp* оперона на чувствительность к гентамицину у *S. aureus* была экспериментально верифицирована в работе M. Vestergaard и соавт. [24].

Существует предположение, что изменение клеточного дыхания за счёт изменения работы электрон-транспортной цепи влияет на электрический потенциал мембраны, что в свою очередь, влияет на пенетрацию аминокликозидов внутрь клетки [25]. Мутации в гене *fusA*, обуславливают устойчивость к фузидиевой кислоте, а также к аминокликозидам [26]. В настоящем исследовании только у одного штамма была выявлена мутация в *fusA*, без изменений чувствительности к фузидиевой кислоте. Производные жёлтые колонии штамма SA0937 имели делецию в гене *herS*, участвующем в биосинтезе менахинона [27]. Необычный эффект был отмечен для одного из морфотипов штамма SA0937. У мор-

фотипа, представленного колониями нормального размера, на фоне воздействия гентамицином, появилась устойчивость к даптомицину за счёт мутации в *MprF*. Мутации в *MprF* являются одним из основных механизмов устойчивости к даптомицину; роль аминокислотных замен в бифункциональном домене *MprF* (с 250 по 360 аминокислотный остаток) в повышении МПК достаточно хорошо изучена [28, 29]. Появление ассоциированной устойчивости к даптомицину на фоне формирования устойчивости к гентамицину ранее не было описано. Полученные данные необходимо учитывать, поскольку гентамицин может быть использован в комбинации с даптомицином, например, для лечения эндокардитов [30]. В настоящее время использование гентамицина для лечения стафилококковых инфекций целесообразно использовать в комбинациях с другими антибиотиками. Это обусловлено высокой вероятностью быстрого формирования устойчивости, а также SCV фенотипов, выявление которых ассоциировано с неблагоприятными исходами, такими как затяжные и рецидивирующие стафилококковые инфекции [5].

Заключение

Таким образом, аминокликозиды остаются одной из опций для лечения стафилококковых инфекций, включая инфекции, вызванные MRSA. Однако их использование сопряжено с возможным быстрым формированием устойчивости и толерантности, не связанными с приобретением генов аминокликозид-модифицирующих ферментов, что важно учитывать при назначении данной группы антибиотиков. Целесообразно проводить корректное выявление SCV фенотипов в рутинных лабораториях, особенно у пациентов, которые находятся на терапии гентамицином, а также пациентов с инфекционными эндокардитами и остеомиелитами.

Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда 18-75-10114-П.

Литература/References

1. Serio A. W., Keepers T., Andrews L., Krause K. M. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus*. 2018; 8 (1). doi 10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018.
2. Radlinski L. C., Rowe S. E., Brzozowski R. et al. Chemical Induction of Aminoglycoside Uptake Overcomes Antibiotic Tolerance and Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell Chem Biol*. 2019; 26 (10): 1355–1364 e4. doi 10.1016/j.chembiol.2019.07.009.
3. Balwit J. M., van Langevelde P., Vann J. M., Proctor R. A. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis*. 1994; 170 (4): 1033–1037. doi 10.1093/infdis/170.4.1033.
4. Kriegeskorte A., Lore N. I., Bragonzi A. et al. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are induced by trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and have increased fitness during SXT challenge. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59 (12): 7265–7272. doi 10.1128/AAC.00742-15.
5. Kahl B. C., Becker K., Löffler B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin Microbiol Rev*. 2016; 29 (2): 401–427. doi 10.1128/CMR.00069-15.
6. Brown N. M., Goodman A. L., Horner C. et al. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK. *JAC Antimicrob Resist*. 2021; 3 (1): dlal114. doi 10.1093/jacamr/dlaa114.
7. Davis J. S., Van Hal S., Tong S. Y. Combination antibiotic treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015; 36 (1): 3–16. doi 10.1055/s-0034-1396906.
8. Nicolau D. P., Freeman C. D., Belliveau P. P. et al. Experience with a once-daily aminoglycoside program administered to 2,184 adult patients.

- Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39 (3): 650–655. doi 10.1128/AAC.39.3.650.
9. Fridman O., Goldberg A., Ronin I. et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*. 2014; 513 (7518): 418–421. doi 10.1038/nature13469.
 10. Sprouffske K., Wagner A. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics*. 2016; 17: 172. doi 10.1186/s12859-016-1016-7.
 11. Brown J., Pirrung M., McCue L. A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*. 2017; 33 (19): 3137–3139. doi: 10.1093/bioinformatics/btx373.
 12. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30 (15): 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
 13. Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012; 19 (5): 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
 14. Barrick J. E., Colburn G., Deatherage D. E. et al. Identifying structural variation in haploid microbial genomes from short-read resequencing data using breseq. *BMC Genomics*. 2014; 15: 1039. doi: 10.1186/1471-2164-15-1039.
 15. Гостев В. В., Сопова Ю. В., Калиногорская О. С. et al. Влияние шоковых концентраций ванкомицина на формирование гетерорезистентности *Staphylococcus aureus*. Антибиотики и химиотер. 2020; 65 (9–10): 3–7. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-9-10-3-7>. [Gostev V. V., Sopova Yu. V., Kalinogorskaya O. S., Velizhanina M. E., Lazareva I. V., Starkova P. S., Sidorenko S. V. The Effects of shock vancomycin concentrations on the formation of heteroresistance. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2020; 65 (9–10): 3–7. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-9-10-3-7>. (in Russian)]
 16. Hodiadmont C. J., van den Broek A. K., de Vroom S. L. et al. Clinical pharmacokinetics of gentamicin in various patient populations and consequences for optimal dosing for gram-negative infections: an updated review. *Clin Pharmacokinet*. 2022; 61 (8): 1075–1094. doi: 10.1007/s40262-022-01143-0.
 17. Khare A., Tavazoie S. Extreme Antibiotic persistence via heterogeneity-generating mutations targeting translation. *mSystems*. 2020; 5 (1): doi: 10.1128/mSystems.00847-19.
 18. Schaaff F., Bierbaum G., Baumert N. et al. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2003; 293 (6): 427–435. doi: 10.1078/1438-4221-00282
 19. Tuchscher L., Kreis C. A., Hoerr V. et al. *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71 (2): 438–448. doi: 10.1093/jac/dkv371.
 20. Ibacache-Quiroga C., Oliveros J. C., Couce A., Blazquez J. Parallel evolution of high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* under low and high mutation supply rates. *Front Microbiol*. 2018; 9: 427. doi: 10.3389/fmicb.2018.00427.
 21. Ng J. M. L., Ngeow Y. E., Saw S. H. et al. Mutations in atpG2 may confer resistance to gentamicin in *Listeria monocytogenes*. *J Med Microbiol*. 2022; 71 (12). doi: 10.1099/jmm.0.001618.
 22. Vestergaard M., Nohr-Meldgaard K., Bojer M. S. et al. Inhibition of the ATP synthase eliminates the intrinsic resistance of *Staphylococcus aureus* towards polymyxins. *mBio*. 2017; 8 (5). doi: 10.1128/mBio.01114-17.
 23. Liu L., Beck C., Nohr-Meldgaard K. et al. Inhibition of the ATP synthase sensitizes *Staphylococcus aureus* towards human antimicrobial peptides. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 11391. doi: 10.1038/s41598-020-68146-4.
 24. Vestergaard M., Leng B., Haaber J. et al. Genome-Wide Identification of antimicrobial intrinsic resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*. 2016; 7: 2018. doi: 10.3389/fmicb.2016.02018.
 25. Lobritz M. A., Belenky P., Porter C. B. et al. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112 (27): 8173–8180. doi: 10.1073/pnas.1509743112.
 26. Rodriguez de Evgrafov M. C., Faza M., Asimakopoulou K., Sommer M. O. A. Systematic investigation of resistance evolution to common antibiotics reveals conserved collateral responses across common human pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 65 (1). doi: 10.1128/AAC.01273-20.
 27. Desai J., Liu Y. L., Wei H. et al. Structure, function, and inhibition of *Staphylococcus aureus* heptaprenyl diphosphate synthase. *ChemMedChem*. 2016; 11 (17): 1915–1923. doi: 10.1002/cmdc.201600311.
 28. Kang K. M., Mishra N. N., Park K. T. et al. Phenotypic and genotypic correlates of daptomycin-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Microbiol*. 2017; 55 (2): 153–159. doi: 10.1007/s12275-017-6509-1.
 29. Steed M. E., Hall A. D., Salimnia H. et al. Evaluation of daptomycin non-susceptible *Staphylococcus aureus* for stability, population profiles, mprf mutations, and daptomycin activity. *Infect Dis Ther*. 2013; 2 (2): 187–200. doi: 10.1007/s40121-013-0021-7.
 30. Jiang J. H., Peleg A. Y. Daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*: the role of combination therapy with daptomycin and gentamicin. *Genes (Basel)*. 2015; 6: 4: 1256–67. doi: 10.3390/genes6041256.

Информация об авторах

Гостев Владимир Валерьевич — к. б. н., старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»; доцент кафедры, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России. Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. Scopus Author ID: 55614534400

Калиногорская Ольга Серафимовна — к. м. н., научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-1419-9068. WOS Researcher ID: AAW-3832-2020. Scopus Author ID: 56525317800

Сулян Офелия Спартаковна — младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-3493-0583. WOS Researcher ID: AAB-3314-2021. Scopus Author ID: 57219423522

Чулкова Полина Сергеевна — младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных бо-

About the authors

Vladimir V. Gostev — Ph. D. in Biology, Senior Research Fellow, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency; Associate Professor of the Department, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-3480-8089. WOS Researcher ID: P-1949-2016. Scopus Author ID: 55614534400

Olga S. Kalinogorskaya — Ph. D. in Medicine, Research Fellow, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-1419-9068. WOS Researcher ID: AAW-3832-2020. Scopus Author ID: 56525317800

Ofeliia S. Sulian — Junior Research Fellow, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-3493-0583. WOS Researcher ID: AAB-3314-2021. Scopus Author ID: 57219423522

Polina S. Chulkova — Junior Research Fellow, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia.

лезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-6279-944X. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

Сопова Юлия Викторовна — к. б. н., ведущий научный сотрудник, Санкт-Петербургский государственный университет; научный сотрудник, Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-7825-273X. WOS Researcher ID: N-5112-2015. Scopus Author ID: 57203508462

Велижанина Мария Евгеньевна — младший научный сотрудник, Санкт-Петербургский государственный университет; младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-9005-527X. Scopus Author ID: 57204238529

Плешков Вячеслав Юрьевич — врач-бактериолог, ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе»; лаборант-исследователь, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

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

Сидоренко Сергей Владимирович — д. м. н., профессор, чл.-корр РАН, заведующий научно-исследовательским отделом, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-3550-7875. WOS Researcher ID: 7875 E-5870-2011. Scopus Author ID: 7102484509

ORCID: 0000-0002-6279-944X. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

Julia V. Sopova — Ph. D. in Biology, Leading Research Fellow, St. Petersburg State University; Research Fellow, St. Petersburg Branch of the Vavilov Institute of General Genetics, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-7825-273X, WOS Researcher ID: N-5112-2015, Scopus Author ID: 57203508462

Maria E. Velizhanina — Junior Research Fellow, St. Petersburg State University; Junior Research Fellow, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-9005-527X, Scopus Author ID: 57204238529

Vyacheslav Yu. Pleshkov — Physician-Bacteriologist, St. Petersburg Research Institute of Emergency Medicine named after I. I. Dzhanelidze; Laboratory Assistant-Researcher, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

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

Sergey V. Sidorenko — D. Sc. in Medicine, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Research Department, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency; Professor of the Department, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-3550-7875. WOS Researcher ID: 7875 E-5870-2011. Scopus Author ID: 7102484509

Оценка противовирусной активности препаратов группы производных полимерных электролитов в отношении широкого спектра вирусов

*Д. Н. РАЗГУЛЯЕВА¹, А. М. КЛАБУКОВ¹, А. В. ГАЛОЧКИНА¹,
А. В. ГАРШИНИНА¹, О. Н. ЖУРАВСКАЯ², И. И. ГАВРИЛОВА²,
В. А. МАНАХОВ³, Н. А. НЕСТЕРОВА², А. А. ШТРО¹, Е. Ф. ПАНАРИН²

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

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

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

Evaluation of the Antiviral Activity of Drugs from the Group of Polymer Electrolyte Derivatives against a Wide Range of Viruses

*DARIA N. RAZGULYAEVA¹, ARTYOM M. KLABUKOV¹, ANASTASIA V. GALOCHKINA¹,
ANZHELIKA V. GARSHININA¹, OLGA N. ZHURAVSKAYA², IRINA I. GAVRILOVA²,
VITALY A. MANAKHOV³, NATALYA A. NESTEROVA², ANNA A. SHTRO¹, EVGENIY F. PANARIN²

¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Macromolecular Compounds of the RAS, Saint-Petersburg, Russia

³ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Актуальность. Современная система здравоохранения постоянно совершенствуется и вводит новые меры для защиты населения от вирусных заболеваний, однако опыт пандемии COVID-19 показал, что инфекционный процесс трудно контролировать в глобальных масштабах. В связи с этим, как никогда актуальна разработка новых противовирусных препаратов широкого спектра действия. **Цель.** Исследование противовирусной активности и цитотоксичности сополимеров стиролсульфоната натрия с виниловыми мономерами различного химического строения и выявление среди них полимеров, перспективных для углубленного изучения и разработки новых противовирусных средств на их основе. **Материал и методы.** Было синтезировано 14 сополимеров стиролсульфоната натрия (CCNa) с различными функциональными сомономерами. Для оценки противовирусной активности были выбраны три вируса с разными стратегиями репродукции и способами передачи — респираторно-синцициальный вирус, вирус гриппа и вирус герпеса. **Результаты.** В результате проведенного скрининга выявлены сополимеры, проявляющие высокую активность в отношении всех трёх вирусов. Установлено, что введение в структуру CCNa различных функциональных групп не приводит к снижению противовирусной активности, но существенно снижает цитотоксичность. Установлено заметное влияние на активность молекулярной массы. Выявлена различная чувствительность вирусов и клеток к исследованным полимерам, что вероятно связано с особенностями строения оболочки вируса и стенки клеток. **Заключение.** Полученные результаты демонстрируют перспективность сополимеров стиролсульфоната натрия в качестве модели для разработки противовирусного препарата широкого спектра действия.

Ключевые слова: грипп; герпес; респираторно-синцициальный вирус; полимерные соединения; стиролсульфонат натрия; противовирусная активность

Для цитирования: Разгуляева Д. Н., Клабуков А. М., Галочкина А. В., Гаршинина А. В., Журавская О. Н., Гаврилова И. И., Манахов В. А., Нестерова Н. А., Штро А. А., Панарин Е. Ф. Оценка противовирусной активности препаратов группы производных полимерных электролитов в отношении широкого спектра вирусов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68 (9–10): 34–41. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-34-41>.

Abstract

Background. The modern healthcare system is constantly improving and introducing new measures to protect the population from viral diseases, but the experience of the COVID-19 pandemic has shown that infections cannot always be controlled on global scale. In this regard, the development of new broad-spectrum antiviral drugs is more relevant than ever. The aim of the study was to investigate the antiviral activity and cytotoxicity of copolymers of sodium styrene sulfonate and vinyl monomers of various chemical structures, as well as to identify promising polymers for the devel-

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. профессора Попова, д. 15/17, НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева, г. Санкт-Петербург, Россия, 197022. E-mail: drazgulyaeva@bk.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 15/17 Prof. Popova st., Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, 197022 Russia. E-mail: drazgulyaeva@bk.ru

opment of new antiviral agents. Materials and methods. 14 copolymers of sodium styrene sulfonate (NaSS) with various functional comonomers were synthesized. Three viruses with different reproduction strategies and transmission methods — respiratory syncytial virus, influenza virus, and herpes virus — were selected for the assessment of antiviral activity. Results. The screening identified copolymers that showed high activity against all three viruses. It was found that the introduction of various functional groups into the structure of NaSS did not decrease antiviral activity, but significantly reduced cytotoxicity. The molecular weight has also shown a noticeable effect on the activity. Different sensitivity of viruses and cells to the studied polymers was revealed, likely due to the structural features of the virus shell and cell wall. Conclusions. The results demonstrate the potential of sodium styrene sulfonate copolymers as a model for developing a broad-spectrum antiviral drug.

Keywords: influenza; herpes; respiratory syncytial virus; polymer compounds; sodium styrene sulfonate; antiviral activity

For citation: Razgulyaeva D. N., Klabukov A. M., Galochkina A. V., Garshinina A. V., Zhuravskaya O. N., Gavrilova I. I., Manakhov V. A., Nesterova N. A., Shtro A. A., Panarin E. F. Evaluation of the antiviral activity of drugs from the group of polymer electrolyte derivatives against a wide range of viruses. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 34–41. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-34-41>.

Введение

Возникновение и распространение вирусных заболеваний в настоящее время происходит практически бесконтрольно вследствие процессов глобализации, повсеместного распространения самолётного сообщения и концентрации населения в крупных городах [1]. Современная система здравоохранения находится в постоянном процессе улучшения и совершенствования с целью защитить население от новых и старых, известных и неизвестных инфекционных болезней. Тем не менее, несмотря на усилия, предпринимаемые медицинским сообществом, опасность вирусных инфекций, различных по тяжести и распространённости, продолжает существовать. Недавние события, включающие в себя пандемию SARS-CoV-2, говорят о том, что вирусные инфекции продолжают угрожать человеческим жизням по всему миру [2].

Одной из самых распространённых групп вирусных заболеваний являются респираторные, представляющие собой опасность в первую очередь ввиду быстрой передачи от человека к человеку (в основном воздушно-капельным путём). К этой группе относятся: грипп [3], риновирусная [4], коронавирусная, респираторно-синцитиальная вирусная [5], аденовирусная и парагриппозная [6], а также метапневмовирусная инфекции [7]. Большая часть из них вызывает ежегодные эпидемии в холодное время, периодически приводя к пандемиям, захватывающим весь земной шар.

Не меньшую угрозу представляют вирусы, передающиеся контактным путём. К ним относятся: вирус герпеса [8], ротавирус [9], энтеровирусы, среди которых можно отметить вирусы Коксаки [10], а также множество других патогенов. Во время пандемии COVID-19 число случаев заражения этими инфекциями снизилось за счёт широкого использования дезинфектантов, однако после отмены большинства коронавирусных ограничений, общий объём «болезней грязных рук» существенно вырос [11].

Вирусы обладают множеством инструментов для изменения своих свойств за счёт высокой скорости размножения, быстроты мутационного процесса и разнообразия возникающих вариантов. Из-за этой особенности высок риск возникновения резистентности к существующим химиопрепаратам, а также возникновения новых, пандемических штаммов с повышенной вирулентностью.

Для борьбы с вирусными инфекциями активно применяется как поддерживающее лечение, так и этиотропная терапия, направленная непосредственно на причину заболевания — вирус. Противовирусные препараты делятся на множество классов, в зависимости от белковой мишени и вируса, на который они действуют. Препарат может ингибировать связывание вируса с клеткой или блокировать проникновение вириона через мембрану и почкование с ней, как, например, ингибитор нейраминидазы осельтамивир [12]. Широко распространены различные нуклеозидные аналоги, например, препарат широкого спектра рибавирин [13], или препарат молнупиравир, недавно зарегистрированный для лечения SARS-CoV-2 [14].

Наиболее перспективными можно считать препараты широкого спектра действия. В клинических условиях не всегда можно быстро установить инфекционный агент, поэтому такие препараты могут не только помогать тяжёлым пациентам, у которых по различным иным причинам неизвестна причина заболевания, но и быть своеобразным «универсальным лекарством», назначаемым при любом ОРВИ. Такие препараты, как правило, действуют на самые консервативные вирусные белки, например на вирусную полимеразу. Однако генетическое и антигенное разнообразие вирусов велико, поэтому подобрать одну молекулу, подходящую для лечения всех вирусных инфекций, просто невозможно.

В качестве одного из подходов, приближающих исследователей к поиску таких универсальных противовирусных средств, можно назвать ис-

пользование перспективного класса противовирусных веществ — водорастворимых полиэлектролитов, которые позволяют синтезировать на их основе новые полимеры заданной молекулярной массы и архитектуры с широкой вариацией функциональных групп, высокомолекулярных соединений — полиэлектролитов, блокирующих связывание вируса с поверхностными рецепторами клеток.

В силу неспецифичности данного механизма действия, полиэлектролиты должны предотвращать заражение клеток широким спектром вирусов. К подобным соединениям относится, например, препарат катапол, обладающий обширными противовирусными и антибактериальными свойствами в отношении возбудителей многих инфекционных заболеваний [15]. Также описаны противовирусные свойства серосодержащих полимеров в отношении нескольких оболочечных вирусов, включая вирус гриппа [16]. Различные фосфатсодержащие полимеры обладают противовирусной активностью в отношении SARS-CoV-2 и ВИЧ [17, 18].

Высокую противовирусную активность проявляют природные полимеры — фосфаты и сульфаты полисахаридов [19], а также синтетические анионные полиэлектролиты [20, 21]. Их активность обусловлена способностью блокировать взаимодействие вируса с клеткой «хозяина», индуцировать выработку организмом интерферона, активировать макрофаги и стимулировать неспецифическую устойчивость организма к внешним инфекциям. Среди большого числа различных полианионов наиболее детально изучен полистиролсульфонат натрия [22, 23]. Он воздействует на респираторные вирусы и активен как анти-ВИЧ агент.

Модификация полистиролсульфоната натрия путём введения в его структуру звеньев другого строения представляет интерес при изучении влияния химического строения сополимеров на противовирусную активность и осуществлении поиска новых полимеров с улучшенным спектром действия, низкой токсичностью и более высокой активностью.

Цель работы — исследование противовирусной активности и цитотоксичности сополимеров стиролсульфоната натрия с виниловыми мономерами различного химического строения и выявление среди них полимеров, перспективных для углублённого изучения и разработка на их основе новых противовирусных средств. Активность препаратов изучалась в отношении трёх вирусов, существенно отличающихся друг от друга по генетической структуре, способу репликации и пути передачи, а именно вирусов гриппа, герпеса и респираторно-синцитиального вируса.

Материал и методы

Исследуемые соединения. Объекты исследования: сополимеры стиролсульфоната натрия (CCNa) с функциональными сомономерами (винилсульфонат натрия (BCNa), *p*-метакрилоиламидосалициловая кислота (MACK), *p*-метакрилоиламидобензойная кислота (MABK)) с гидрофильными и гидрофобными нейтральными виниловыми сомономерами (N-винилпирролидон (ВП), N-винилформамид (ВФА), N-метил-N-винилацетамид (МВАА), 2-деокси-2-метакриламидо-D-глюкоза (МАГ), стирол (Ст), акриламид (АА)).

Сополимеры синтезировали методом радикальной сополимеризации в массе или растворителе, при температуре 65°C в атмосфере инертного газа с использованием азоинициаторов: 2,2'-бисазобисизобутиронитрила (ДАК) и 2,2'-азобис-2-метилпропанамидин дигидрохлорида (МПИХ) с последующим выделением их стандартными методами. Состав полученных сополимеров и их структура определялись функциональным анализом, а также по данным элементного анализа на азот, серу, ИК- и УФ-спектроскопией. Строение синтезированных сополимеров подтверждали методами УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии. Молекулярную массу оценивали вискозиметрическим методом в растворе 0,1 н NaCl при 25°C. Характеристики синтезированных сополимеров представлены в табл. 1.

Культуры клеток и вирусы. В работе использовались следующие перевиваемые клеточные культуры: Vero (клетки почки зелёной мартышки), MDCK (клетки почки собаки), а также культура клеток Нер-2 (клетки эпидермоидной карциномы гортани человека), полученные из коллекции клеточных культур лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России.

Клеточную культуру рассеивали за сутки до исследования на плоскостонные культуральные 96-луночные планшеты в концентрации 3×10^5 клеток/мл. Для культивирования использовалась ростовая среда ДМЕМ (Биолот, Россия), содержащая 10% фетальной бычьей сыворотки (Биолот, Россия), а также 20 мкг/мл ципрофлоксацина. Инкубация проводилась при 37°C в присутствии 5% CO₂.

Использованные вирусы: вирус гриппа типа А, штамм A/Aichi/2/68(H3N2); Респираторно-синцитиальный вирус, штамм А2, вирус простого герпеса 1 типа, штамм ЕС, были получены из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России.

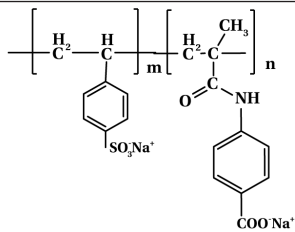
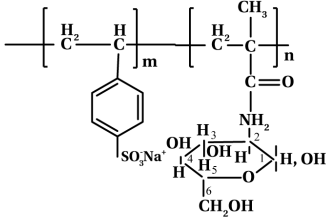
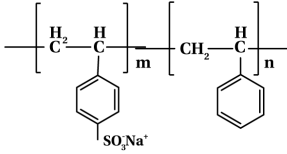
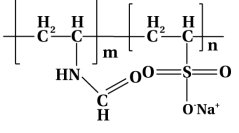
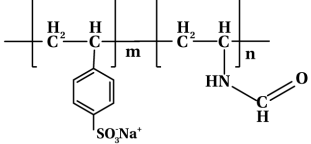
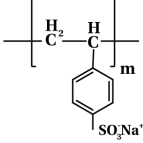
Оценка цитотоксичности препаратов. Цитотоксичность исследуемых препаратов была оценена при помощи МТТ-теста. Из 96-луночного планшета с клеточной культурой удаляли ростовую среду, вносили серию 2-кратных разведений препаратов на поддерживающей среде (стартовая концентрация 2000 мкг/мл), а в ряд клеточного контроля вносили среду без препарата. Далее 96-луночный планшет с разведениями препарата инкубировали в течение 3 сут (Vero и MDCK) или 6 сут (Нер-2).

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

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

Оценка противовирусной активности сополимеров в отношении вирусов гриппа, герпеса и респираторно-синцитиального вируса. Для оценки противовирусной активности веществ в отношении вируса гриппа готовили серию пяти трёхкратных разведений препарата в двойной концентрации, начиная от ЦТД₅₀, и семи десятикратных разведений вируса

Продолжение табл. 1
Table 1 continued

Шифр	Сомономер наименование		Структурная формула	Состав сополимера, мол. %		$M_n \times 10^{-3}$
	m1	m2		m1	m2	
R7	CCNa	МАБК		70	30	121
R41	CCNa	МАГ		71	29	690
R37	CCNa	СТ		67	33	37
R57	ВФА	BCCNa		88	12	85
R66	CCNa	ВФА		44	56	74
R47	CCNa	—		100	—	360

на поддерживающей среде (DMEM («Биолот», Россия); L-глютамин («Биолот», Россия); 20 мкг/мл ципрофлоксацина; 4 мкг/мл трипсина).

Из 96-луночных планшетов с культурой клеток MDCK удаляли ростовую среду и однократно промывали поддерживающей средой, вносили раствор полимера по 100 мкл на лунку и равный объем вируса, после чего 1 ч инкубировали при 37°C и 5% CO₂. По истечении срока инкубации планшеты промывали поддерживающей средой и снова вносили препарат и равный объем среды. Планшеты инкубировали в течение 72 ч при 37°C и 5% CO₂.

Затем титр вируса определяли с помощью реакции геммагглютинации (РГА).

Для оценки противовирусной активности веществ в отношении респираторно-синцициального вируса готовили серию из пяти трехкратных разведений раствора полимера, начиная от ЦТД₅₀, в двойной концентрации и семи десятикратных разведений вируса. Из 96-луночных планшетов с клеточной культурой Нер-2 удаляли ростовую среду и промывали один раз поддерживающей средой DMEM («Био-

лот», Россия), 20 мкг/мл ципрофлоксацина, 2% ФБС («Биолот», Россия), после чего добавляли полимер по 100 мкл на лунку и равный объем вируса, далее 1 ч инкубировали при 37°C и 5% CO₂. После планшеты промывали поддерживающей средой, снова добавляли 100 мкл препарата на лунку и равный объем поддерживающей среды, инкубировали в течение 6 сут при 37°C и 5% CO₂.

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

Для оценки противовирусной активности в отношении вируса простого герпеса первого типа готовили серию 3-кратных разведений веществ, начиная от 2 ЦТД₅₀ на поддерживающей среде Альфа-МЕМ (Биолот, Россия), содержащую 20 мкг/мл ципрофлоксацина и 2% фетальной бычьей сыворотки (Биолот, Россия).

Эти растворы вносили в культуру клеток Vero по 100 мкл на лунку 96-луночного планшета в двукратной концентрации и сразу же добавляли по 100 мкл вируса с концентрацией вирусных частиц в аликвоте не менее 10⁶, в серии из семи

10-кратных разведений (10^{-1} – 10^{-7}) и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C и 5% CO₂, клетки отмывали от вируса поддерживающей средой и снова вносили в лунки по 100 мкл разведений тестируемого средства, затем во все лунки вносили по 100 мкл поддерживающей среды.

Планшеты инкубировали в течение 3 сут при температуре 37°C и 5% CO₂ в CO₂ инкубаторе, а затем оценивали выживаемость клеток с помощью МТТ-теста.

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

Результаты

Оценка цитотоксичности сополимеров в отношении разных клеточных культур. На первом этапе оценивали цитотоксичность сополимеров в отношении трёх культур клеток: Vero (является хозяином для вируса герпеса), MDCK (для вируса гриппа) и HEp-2 (для респираторно-синцитиального вируса). Результаты исследования представлены в табл. 2.

Из представленных в табл. 2 данных видно, что исследованные вещества являются малотоксичными для использованных клеточных культур, что может быть связано с полимерной структурой соединений, которые в силу большого размера неспособны проникать внутрь клетки.

Вместе с тем сополимер R41 показал заметную цитотоксичность в отношении клеточной культуры Нер-2.

Противовирусная активность сополимеров в отношении вирусов гриппа, герпеса и респираторно-синцитиального вируса. Противовирусную активность изучаемых веществ оценивали в диапазоне концентраций близких к значению ЦТД₅₀. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Данные о противовирусной активности сополимеров CCNa в отношении вирусов гриппа, герпеса и респираторно-синцитиального вируса

Table 3. Data on the antiviral activity of NaSS copolymers against influenza viruses, herpes and respiratory syncytial virus

Препарат	Респираторно-синцитиальный вирус		Вирус гриппа		Вирус герпеса	
	ЭД ₅₀	ХТИ	ЭД ₅₀	ХТИ	ЭД ₅₀	ХТИ
R80	<3,7	>270,0	<3,7	>270,3	<3,7	>81,0
R7	1,7	154,2	—	—	—	—
R9	1,9	164,6	1,0	137,2	<3,7	>17,3
R10	2,4	195,3	1,1	129,1	<3,7	>218,4
R11	1,7	154	—	—	—	—
R12	1,9	143,6	—	—	—	—
R13	2,5	110,2	—	—	—	—
R14	2,0	97,5	—	—	—	—
R57	<3,7	>270,0	96,3	6,6	>278,9	<1,0
R8	1,3	146,9	2,0	120,7	<3,7	>171,0
R37	1,5	152,6	0,9	93,6	<3,7	>155,4
R41	0,2	178,0	<1,1	>81,8	<3,7	>135,9
R47	1,3	125,0	—	—	—	—
R66	0,5	551,2	0,9	242,2	<3,7	>48,1

Таблица 2. Цитотоксичность исследуемых соединений в отношении клеточных культур Vero, MDCK и HEp-2

Table 2. Cytotoxicity of the studied compounds against Vero, MDCK, and HEp-2 cell cultures

Препарат	Значение ЦТД ₅₀ , мкг/мл		
	HEp-2	MDCK	Vero
R80	>1000,0	>1000,0	>300,0
R14	195,1	—	—
R13	275,5	—	—
R9	312,8	133,1	64,3
R10	468,7	140,8	808,2
R11	261,9	—	—
R12	272,9	—	—
R57	>1000,0	636,7	278,9
R7	262,1	—	—
R8	191,0	240,3	632,7
R37	228,9	82,4	575,1
R41	35,6	89,4	502,7
R47	163,4	—	—
R66	275,6	208,3	177,9

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что все исследованные вещества проявляют высокую противовирусную активность в отношении респираторно-синцитиального вируса, вирусов гриппа и герпеса. Однако наблюдается разная чувствительность вирусов к исследованным полимерам, что, вероятно, обусловлено отличиями в строении их оболочки. Следует отметить низкую активность соединения R57 в отношении гриппа и герпеса.

В результате проведённого скрининга выявлены сополимеры R80, R9, R10, R8, R37, и R41, проявляющие высокую активность в отношении всех трёх вирусов, что может свидетельствовать о неспецифичности механизма взаимодействия синтезированных сополимеров CCNa с исследуемыми вирусами. Можно предположить, что полимеры проявляют активность на начальной стадии вирусного цикла, либо действуют профи-

лактически, создавая с помощью своей структуры механическую преграду для проникновения вируса в клетку.

Заключение

С использованием методологии медицинской химии, основанной на систематическом изменении строения биологически активных веществ и установлении взаимосвязи структура — биологическая активность, осуществлён синтез 14 анионных водорастворимых полиэлектролитов на основе CCNa различного химического строения, варьируемого состава и молекулярной массы. В структуру макромолекулы CCNa были введены:

1. Нейтральные гидрофильные группы — N-виниламиды (BA) с открытой цепью (N-винилформамид, N-метил-N-винилацетамид) и циклический BA (N-винилпирролидон), а также акриламид и метакрилоиламидаглюкоза, содержащая углеводный фрагмент.

2. Гидрофобные ароматические группы — стирол.

3. Ионогенные звенья, содержащие ароматические аминокислоты — п-аминосалициловую и п-аминобензойную.

Проведено сравнительное изучение противовирусной активности синтезированных сополимеров в отношении оболочечных вирусов гриппа, герпеса и респираторно-синцитиального,

а также цитотоксичности в отношении клеток Vero, Hep-2, MDCK.

В результате проведённого скрининга выявлены сополимеры R10, R9, R66, R80, R8, R41, R37, проявляющие высокую активность в отношении всех трёх вирусов. Установлено, что введение в структуру CCNa, различных функциональных групп не приводит к снижению противовирусной активности, но существенно снижает цитотоксичность (R80, R10, R12, R9, R66, R13, R11, R7, R37, R57).

Установлено заметное влияние на активность молекулярной массы (R9 и R66).

Выявлена различная чувствительность вирусов и клеток к исследованным полимерам, что вероятно связано с особенностями строения оболочки вируса и стенки клеток. Выявлены перспективные полимеры для дальнейшего изучения и разработки на их основе лекарственных противовирусных средств.

Дополнительная информация

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Baker R.E., Mahmud A.S., Miller I.F. *et al.* Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20 (4): 193–205. doi: 10.1038/s41579-021-00639-z.
2. Bloom D.E., Cadarette D. Infectious disease threats in the twenty-first century: Strengthening the global response. *Front Immunol.* 2019; 10 (MAR). doi: 10.3389/fimmu.2019.00549.
3. Gordon A., Reingold A. The Burden of influenza: a complex problem. *Curr Epidemiol Rep.* 2018; 5 (1): 1–9. doi: 10.1007/s40471-018-0136-1.
4. Zimmerman R.K., Balasubramani G.K., D'Agostino H.E.A. *et al.* Population-based hospitalization burden estimates for respiratory viruses, 2015–2019. *Influenza Other Respir Viruses.* 2022; 16 (6): 1133–1140. doi: 10.1111/irv.13040.
5. Geoghegan S., Erviti A., Caballero M.T. *et al.* Mortality due to respiratory syncytial virus. Burden and risk factors. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017; 195 (1): 96–103. doi: 10.1164/rccm.201603-0658OC.
6. Branche A., Falsey A. Parainfluenza Virus Infection. *Semin Respir Crit Care Med.* 2016; 37 (04): 538–554. doi: 10.1055/s-0036-1584798.
7. Edwards K.M., Zhu Y., Griffin M.R. *et al.* Burden of Human Metapneumovirus Infection in Young Children. *N Engl J Med.* 2013; 368 (7): 633–643. doi: 10.1056/NEJMoa1204630.
8. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T. *et al.* Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. *PLoS One.* 2015; 10 (10): e0140765. doi: 10.1371/journal.pone.0140765.
9. Badur S., Öztürk S., Pereira P. *et al.* Systematic review of the rotavirus infection burden in the WHO-EMRO region. *Hum Vaccin Immunother.* 2019; 15 (11): 2754–2768. doi: 10.1080/21645515.2019.1603984.
10. Mao Q., Wang Y., Yao X. *et al.* Coxsackievirus A16. *Hum Vaccin Immunother.* 2014; 10 (2): 360–367. doi: 10.4161/hv.27087.
11. Jiao Y., Han T., Qi X. *et al.* Human rotavirus strains circulating among children in the capital of China (2018–2022) predominance of G9P[8] and emergence of G8P[8]. *Heliyon.* 2023; 9 (8): e18236. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18236.
12. McClellan K., Perry C.M., Aoki F.Y., Fleming D.M., Sidwell R.W., Treanor J.J. Oseltamivir: a review of its use in influenza. *Drugs.* 2001; 61 (2): 263–283. doi: 10.2165/00003495-200161020-00011.
13. Kataev V.E., Garifullin B.F. Antiviral nucleoside analogs. *Chem Heterocycl Compd (N Y).* 2021; 57 (4): 326–341. doi: 10.1007/s10593-021-02912-8.
14. Mohd I., Arora K.M., Asdaq S.M.B. *et al.* Discovery, development, and patent trends on molnupiravir: a prospective oral treatment for COVID-19. *Molecules.* 2021; 26 (19): 5795. doi: 10.3390/molecules26195795.
15. Zhang L.Q., Chen K.X., Li Y.M. Bioactivities of natural catalpol derivatives. *Curr Med Chem.* 2019; 26 (33): 6149–6173. doi: 10.2174/092986732666190620103813.
16. Kultys A. Sulfur-containing polymers. In: *Encyclopedia of polymer science and technology.* 2010; 67.
17. Schepler H., Wang X., Neufurth M., Wang S., Schröder H.C., Müller W.E.G. The therapeutic potential of inorganic polyphosphate: A versatile physiological polymer to control coronavirus disease (COVID-19). *Theranostics.* 2021; 11 (13): 6193–6213. doi: 10.7150/tno.59535.
18. Yang S., Pannecouque C., Herdewijn P. Synthesis, and in vitro enzymatic and antiviral evaluation of d4t polyphosphate derivatives as chain terminators. *Chem Biodivers.* 2012; 9 (10): 2186–2194. doi: 10.1002/cbdv.201200250.
19. De Clercq E. New Perspectives for the treatment of HIV infections. *Collect Czechoslov Chem Commun.* 1998; 63 (4): 449–479. doi: 10.1135/cccc19980449.
20. Bianculli R.H., Mase J.D., Schulz M.D. Antiviral polymers: past approaches and future possibilities. *Macromolecules.* 2020; 53 (21): 9158–9186. doi: 10.1021/acs.macromol.0c01273.
21. Schandock F., Riber C.F., Röcker A. *et al.* Macromolecular antiviral agents against zika, ebola, sars, and other pathogenic viruses. *Adv Healthc Mater.* 2017; 6 (23). doi: 10.1002/adhm.201700748.
22. Anderson R.A., Feathergill K., Diau X. *et al.* Evaluation of poly(styrene-4-sulfonate) as a preventive agent for conception and sexually transmitted diseases. *J Androl.* 2000; 21 (6): 862–875. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03417.x.

23. Контаров Н.А., Ермакова А.А., Гребенкина Н.С., Юминова Н.В., Зверев В.В. Изучение противовирусной активности полиэлектролитов в отношении вируса гриппа. Вопросы вирусологии. 2015; 60 (4): 5–9.

[Kontarov N.A., Ermakova A.A., Grebenkina N.S., Jyuminova N.V., Zverev V.V. Izuchenie protivovirusnoj aktivnosti polielektrolitov v otnoshenii virusa grippa. Voprosy Virusologii. 2015; 60 (4): 5–9. (in Russian)]

Информация об авторах

Разгуляева Дарья Николаевна — младший научный сотрудник лаборатории химиотерапии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Клабуков Артём Маркович — младший научный сотрудник лаборатории химиотерапии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Галочкина Анастасия Валерьевна — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории химиотерапии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Гаршинина Анжелика Валерьевна — научный сотрудник лаборатории химиотерапии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Журавская Ольга Николаевна — младший научный сотрудник Института высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН), Санкт-Петербург, Россия

Гаврилова Ирина Иосифовна — научный сотрудник Института высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН), Санкт-Петербург, Россия

Манахов Виталий Александрович — студент Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, Россия

Нестерова Наталья Александровна — научный сотрудник Института высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН), Санкт-Петербург, Россия

Штро Анна Андреевна — к. б. н., заведующий лабораторией химиотерапии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Панарин Евгений Фёдорович — д. х. н., проф., член-корр. РАН, научный руководитель Института высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН), Санкт-Петербург, Россия

About the authors

Daria N. Razgulyaeva — Junior Researcher at the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Artyom M. Klabukov — Junior Researcher at the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Anastasia V. Galochkina — Ph. D. in Biology, Leading Researcher at the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Anzhelika V. Garshinina — Researcher at the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Olga N. Zhuravskaya — Junior Researcher at the Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Irina I. Gavrilova — Research Fellow at the Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Vitaly A. Manakhov — student at the Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

Nesterova Natalya Aleksandrovna — Researcher at the Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Anna A. Shtro — Ph. D. in Biology, Head of the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Evgeniy F. Panarin — D. Sc. in Chemistry, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director of the Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Изучение нефротоксичности антибактериальных ЛС на клеточной линии RPTEC

*В. А. ЕВТЕЕВ¹, И. С. СЕМЕНОВА¹, Н. Д. БУНЯТЯН^{1,2},
А. Б. ПРОКОФЬЕВ^{1,2}, В. Г. КУКЕС¹

¹ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Study of Antibacterial Drugs' Nephrotoxicity in the RPTEC Cell Line

*VLADIMIR A. EVTEEV¹, IRINA S. SEMENOVA¹, NATALYA D. BUNYATYAN^{1,2},
ALEKSEY B. PROKOFIEV^{1,2}, VLADIMIR G. KUKES¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Резюме

Созданная клеточная линия человека RPTEC/TERT1 показала максимальное соответствие с первичными человеческими проксимальными почечными канальцами, что делает оптимальным её использование для исследований нефротоксических свойств ксенобиотиков. Измерение трансэпителиального сопротивления (TEER) является ценным неинвазивным методом, который может быть применён для количественной оценки целостности барьера клеток на различных стадиях их роста и дифференцировки, для прогнозирования токсичности и проницаемости лекарственных средств. *Цель исследования* — изучить динамику изменения трансэпителиального сопротивления на модели клеточной линии RPTEC/TERT1 при инкубации с ЛС, обладающими нефротоксическим действием. *Материал и методы*. Клеточная линия проксимальных почечных канальцев человека RPTEC/TERT1 была получена из банка культур клеток АТСС. В эксперименте использовались клетки 14-го пассажа. Изучались следующие препараты: цисплатин — 2,5 мкг/мл; ванкомицин — 50 мкг/мл; дорипенем — 20 мкг/мл; цефепим — 150 мкг/мл. Для каждой концентрации препарата в эксперименте выполнялось 4–5 повторов. Измерения TEER проводились 4–5 раз для каждой лунки. *Результаты*. Цисплатин, ванкомицин, дорипенем, цефепим в применяемых концентрациях не оказывают цитотоксического действия на клеточную линию RPTEC по данным динамики TEER.

Ключевые слова: антибиотики; клеточные линии; нефротоксичность, трансэпителиальное сопротивление

Для цитирования: Евтеев В.А., Семенова И.С., Бунятян Н.Д., Прокофьев А.Б., Кукес В.Г. Изучение нефротоксичности антибактериальных ЛС на клеточной линии RPTEC. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68 (9–10): 42–45. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-42-45>.

Abstract

The created cell line of human proximal renal tubules RPTEC/TERT1 showed maximum compliance with primary human RPTEC, which makes it optimal for use in studies of the nephrotoxic properties of xenobiotics. Transepithelial resistance measurement (TEER) is a valuable non-invasive method that can be used to quantify the integrity of the cell barrier at various stages of cell growth and differentiation, as well as to predict the toxicity and permeability of drugs. *The aim of the study* was to examine the dynamics of changes in transepithelial resistance in the model of the RPTEC/TERT1 cell line during incubation with drugs with nephrotoxic effects. *Material and methods*. The human proximal renal tubule cell line RPTEC/TERT1 was obtained from the ATCC cell culture bank. Cells at passage 14 were used in the experiment. The following drugs were studied: cisplatin: 2.5 mcg/ml; vancomycin: 50 mcg/ml; doripenem — 20mcg/ml; cefepim — 150mcg/ml. 4–5 repetitions were performed for each concentration of the drug in the experiment. THEER measurements were carried out 4–5 times for each well. *Results*. Cisplatin, vancomycin, doripenem, and cefepim in the concentrations used do not show a cytotoxic effect on the RPTEC cell line according to TEER dynamics.

Keywords: antibiotics; cell lines; nephrotoxicity, transepithelial resistance

For citation: Evteev V. A., Semenova I. S., Bunyatyan N. D., Prokofiev A. B., Kukes V. G. Study of antibacterial drugs' nephrotoxicity in the RPTEC cell line. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68 (9–10): 42–45. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-42-45>.

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: Петровский б-р, д. 8, стр. 2, НЦЭСМП, г. Москва, Россия, 127051.
E-mail: evteev@expmed.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 8/2 Petrovsky Blvd., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051 Russia.
E-mail: evteev@expmed.ru

Введение

В настоящее время клеточные линии эпителия проксимальных почечных канальцев широко используются в качестве экспериментальной модели для исследования нефротоксических свойств не только при разработке новых лекарственных препаратов (ЛП), но и для коррекции фармакотерапии использующихся ЛП в клинической практике. Клеточная линия RPTEC/TERT1 была создана путём иммортализации первичных клеток проксимальных почечных канальцев человека (RPTEC) посредством трансфекции гена субъединицы теломеразы (TERT1). Последующий анализ экспрессии генов специфических транспортёров и метаболических ферментов не выявил значимых различий клеток RPTEC/TERT1 с первичными человеческими RPTEC [1].

Значение трансэпителиального сопротивления (TEER — Transepithelial electrical resistance) является одним из основных показателей, отражающим образование плотных межклеточных контактов в монослое эпителиальных клеточных линий (парацеллюлярное сопротивление), что особенно важно для клеток, выполняющих барьерную и транспортную функцию [2]. TEER является хорошо зарекомендовавшим себя методом, отражающим функциональную активность и уровень дифференцировки клеток эпителия.

Измерение TEER является ценным неинвазивным методом, который может быть применён для количественной оценки целостности монослоя клеток на различных стадиях их роста и дифференцировки, для прогнозирования токсичности и проницаемости клеток для лекарственных средств на ранних стадиях разработки лекарств [3]. Однако возможности его использования при оценке нефротоксических свойств ксенобиотиков, в том числе ЛС, ещё не до конца исследована.

Цель работы — изучить динамику изменения трансэпителиального сопротивления на модели клеточной линии RPTEC/TERT1 при инкубации с ЛС, обладающими нефротоксическим действием.

В данной работе было исследовано влияние нефротоксических ЛС на показатель TEER на модели клеточной линии эпителия проксимальных почечных канальцев RPTEC/TERT1. В качестве ксенобиотиков использовались лекарственные препараты с доказанными нефротоксическими свойствами: ванкомицин и цисплатин [4]. Кроме того, использовались бета-лактамы антибиотики — цефепим [5] и дорипенем [6], для которых в некоторых исследованиях отмечены нефротоксические свойства.

В ходе исследования решались следующие задачи: восстановление и культивирование клеточной линии RPTEC в 24-луночных планшетах «Transwell» с мембранными вставками с диамет-

ром пор 0,4 мкм; измерение показателя трансэпителиального сопротивления до значений, свидетельствующих об образовании плотного монослоя; инкубация RPTEC с ЛС, обладающими нефротоксическим действием; оценка влияния на показатель трансэпителиального сопротивления в клеточной линии RPTEC.

Материал и методы

Клеточная культура и условия культивирования. Клеточная культура проксимальных почечных канальцев человека RPTEC/TERT была получена из банка культур клеток ATCC (код: CRL-4031).

Восстановление клеточной линии производилось по следующей методике: во флакон с 10 мл среды DMEM F12 объёмом 25 см² добавляли культуру клеток, рекомбинантный человеческий фактор роста EGF — 10 нг/мл, трансферрин — 5 мкг/мл, инсулин — 5 мкг/мл, гидрокортизон — 25 нг/мл, селенит натрия — 8,65 нг/мл, затем помещали в инкубатор на 15–20 мин для достижения нормального pH (7,0–7,6). Пробирку с клетками размораживали на водяной бане в течение 2 мин при температуре 37°C. После размораживания флакон обрабатывали 70% этанолом и далее работали в асептических условиях. Содержимое пробирки переносили в пробирку центрифуги, содержащую 9,0 мл культуральной среды и центрифугировали при 250 g 5–7 мин. Супернатант удаляли и ресуспендировали клетки в свежей среде. Полученную суспензию переносили в культуральный флакон. Условия культивирования стандартные: 37°C и 5% CO₂. В эксперименте использовались клетки 14-го пассажа.

Культивирование. 12-й пассаж клеток RPTEC культивировали в 24-луночных планшетах Costar «Transwell» с мембранными вставками с диаметром пор 0,4 мкм. Посевная концентрация 45×10³ кл/см². Количество клеток в каждой лунке составляло примерно 0,2×10⁶. В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 («Gibco», США), 50 ед./мл гентамицина и 0,1 мг/мл пирувата натрия («Santa Cruz», США) при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 80–85%. В среду добавляли инсулин — 5 мкг/мл, трансферрин — 5 мкг/мл, селенит натрия — 5 мкг/мл, hEGF — 10 нг/мл, гидрокортизон — 25 нг/мл. Среду меняли через каждые 2–3 дня. Объём культуральной среды в апикальном отделе — 0,1 мл, в базолатеральном — 0,6 мл.

Трансэпителиальное сопротивление. Измерение проводилось на приборе «ERS-2» («Millipore», США) с помощью электрода «MERSSTX01» («Millipore», США). Измерение проводилось на 5-й день после посева клеток в культуральный планшет один раз в сутки на протяжении 14 сут (кроме выходных дней). Расчёт TEER проводился по формуле: $TEER = (R_{TOTAL(\Omega)} - R_{BLANK(\Omega)}) \times R_{AREA}(cm^2)$, где $R_{TOTAL(\Omega)}$ — сопротивление лунки с монослоем клеток, Ом; $R_{BLANK(\Omega)}$ — сопротивление пустой лунки, Ом; R_{AREA} — площадь мембраны, см² [3].

Лекарственные препараты. Для оценки влияния нефротоксических ЛС на показатель TEER в клеточной линии RPTEC использовались следующие препараты: цисплатин — 2,5 мкг/мл; ванкомицин — 50 мкг/мл; дорипенем — 20 мкг/мл; цефепим — 150 мкг/мл (рис. 1). Цисплатин в нетоксической концентрации использовали в качестве классического нефротоксического лекарственного препарата, который обладает первичной токсичностью для проксимальных почечных канальцев [7]. Концентрация антибиотиков соответствовала их концентрации при назначении в средних терапевтических дозах. Для каждой концентрации препарата в эксперименте выполнялось 4–5 повторов. Стоконый раствор препаратов (100:1) добавляли в базальную камеру 24-луночного планшета Corning Transwell. Измерения TEER проводились 5 раз для каждой лунки.

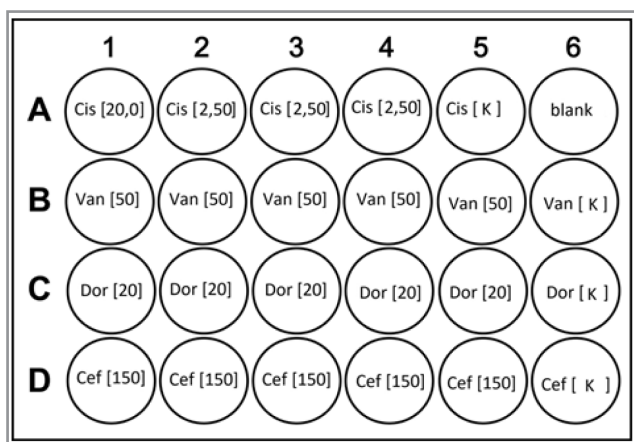


Рис. 1. Схема эксперимента по транспорту.

Примечание. Здесь и на рис. 2: Cis — цисплатин; Dor — дорипенем; Cef — цефепим; blank — лунка не содержащая клеток; K — отрицательный контроль. В квадратных скобках указаны конечные концентрации препаратов в культуральной среде в мкг/мл.

Fig. 1. Transport experiment scheme.

Note. Cis — cisplatin; Dor — doripenem; Cef — cefepime; blank — well that does not contain cells; K — negative control. The final concentrations of drugs in the culture medium in $\mu\text{g/ml}$ are indicated in square brackets.

Результаты и обсуждение

Изменение трансэпителиального сопротивления в монослое клеточной линии RPTEC при инкубации с ЛС показано на рис. 2.

Показатель трансэпителиального сопротивления клеточной линии RPTEC достигает пороговых значений примерно за 2 нед. после посева. Значения TEER ($280\text{--}320 \text{ Ом}\times\text{см}^2$) изучаемого клона RPTEC отличаются от данных в других источниках, но попадают в диапазон значений для данной клеточной линии ($100\text{--}600 \text{ Ом}\times\text{см}^2$) [8].

Первые 3 сут инкубации отмечалось увеличение TEER при культивировании со всеми препаратами. На 4-е сутки инкубации у всех ЛП отмечалось снижение TEER на $15\text{--}20 \text{ Ом}\times\text{см}^2$. На 8-е сутки инкубации зафиксирован рост TEER, что может быть связано с выведением ЛП из клеток, что привело к прекращению их действия на межклеточные контакты. Подобный эффект был зафиксирован в работе L. Aschauer и соавт. [9].

Ни одно из тестируемых соединений не вызывало снижения TEER в концентрациях, считающихся нецитотоксичными.

Выводы

1. Результаты измерения значений TEER находятся в диапазоне, соответствующем данной клеточной линии, согласно данным литературы.

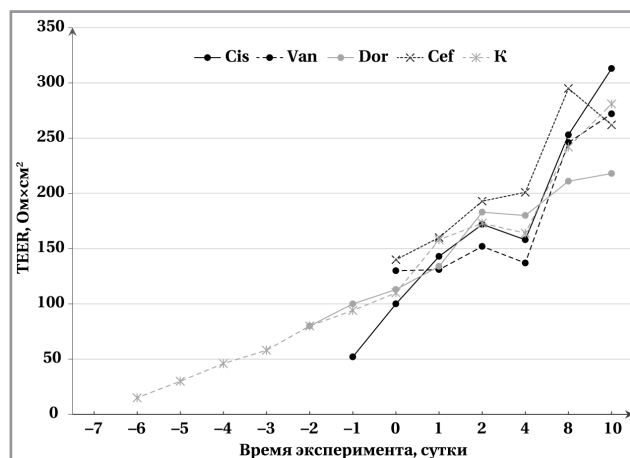


Рис. 2. Трансэпителиальное сопротивление клеточной линии RPTEC при инкубации с препаратами.

Примечание. Данные представлены в формате $M\pm SD$ (среднее $\pm$ стандартное отклонение, данные 5 экспериментов); * — уровень значимости $p<0,05$.

Fig. 2. Transepithelial resistance of the RPTEC cell line during incubation with drugs.

Note. Cis — cisplatin; Dor — doripenem; Cef — cefepime; blank — a well that does not contain cells; K — negative control. Data are presented in $M\pm SD$ format (mean $\pm$ standard deviation, data from 5 experiments); * — significance level $P<0.05$

2. Цисплатин в концентрациях $2,5 \text{ мкМ}$ на изучаемом клоне RPTEC не оказывает нефротоксического эффекта

3. Ванкомицин хотя и понижает значение TEER в монослое RPTEC, тем не менее за 6 сут инкубации оно не достигает критических значений, соответствующих токсическому действию.

4. Цефепим и дорипенем в концентрациях, соответствующих среднетерапевтическим дозам препаратов, не оказывает нефротоксического эффекта.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учёта НИР 121022400082-4).

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

Вклад авторов. В. А. Евтеев — идея и дизайн эксперимента, измерение TEER; И. С. Семенова — культивирование клеточных линий RPTEC, инкубация клеток с лекарственными препаратами; Н. Д. Бунятян — систематизация и анализ данных литературы, критический пересмотр текста статьи; А. Б. Прокофьев, В. Г. Кукес — руководство и общий контроль над экспериментом.

Литература/References

1. Wieser M., Stadler G., Jennings P., Streubel B., Pfaller W., Ambros P., Riedl C., Katinger H., Grillari J., Grillari-Voglauer R. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Nov; 295 (5): F1365–75. doi: 10.1152/ajprenal.90405.2008. Epub 2008 Aug 20. PMID: 18715936.
2. Anderson J.M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci.* 2001; 16: 126–130. doi: 10.1152/physiolonline.2001.16.3.126.
3. Srinivasan B., Kolli A.R., Esch M.B. et al. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015 Apr; 20 (2): 107–126. doi: 10.1177/2211068214561025.
4. Tiong H.Y., Huang P., Sijing X., Li Y. et al. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. *Mol Pharm.* 2014; 11 (7): 1933–1948. doi: 10.1021/mp400720w.
5. Mac K., Chavada R., Paull S. et al. Cefepime induced acute interstitial nephritis — a case report. *BMC Nephrol.* 2015; 16, 15. doi: 10.1186/s12882-015-0004-x.
6. Chavers S., Magee G., Baumer D., Pai H. Use of doripenem and risk of seizure and renal impairment in US hospitalized patients: a retrospective cohort study. *Ther Adv Drug Saf.* 2016 Apr; 7 (2): 43–57. doi: 10.1177/2042098615622330.
7. Secker P.F., Schlichenmaier N., Beilmann M. et al. Functional transepithelial transport measurements to detect nephrotoxicity in vitro using the RPTEC/TERT1 cell line. *Arch Toxicol.* 2019; 93: 1965–1978. doi: 10.1007/s00204-019-02469-8.
8. Wilmer M.J., Ng C.P., Lanz H.L., Vulto P., Suter-Dick L., Masereeuw R., Kidney-on-a-chip technology for drug-induced nephrotoxicity screening. *Trends Biotechnol.* 2016; 34 (2): 156–170. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.11.001.
9. Aschauer L., Limonciel A., Wilmes A. et al. Application of RPTEC/TERT1 cells for investigation of repeat dose nephrotoxicity: a transcriptomic study. *Toxicol In Vitro.* 2015; 30 (1 PtA): 106–116. doi: 10.1016/j.tiv.2014.

Информация об авторах

Евтеев Владимир Александрович — старший аналитик Научного отдела клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6150-5796. ResearcherID: E-1204-2017. eLIBRARY SPIN-код: 3347-0189. Scopus Author ID: 16230318000

Семенова Ирина Семеновна — к. б. н., главный эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9026-0508.

Бунятян Наталья Дмитриевна — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник Научного отдела клинической фармакологии «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии Первого московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0936-5551. ResearcherID: D-3071-2018. eLIBRARY SPIN-код: 9853-1232. Scopus Author ID: 6506018057

Прокофьев Алексей Борисович — д. м. н., профессор, начальник научного отдела клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Первого московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7024-5546. ResearcherID: D-D-2961-2018. eLIBRARY SPIN-код: 1003-0672. Scopus Author ID: 57189082881

Кукес Владимир Григорьевич — д. м. н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник Научного отдела клинической фармакологии «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5112-6928. ResearcherID: D-3908-2018. eLIBRARY SPIN-код: 8498-3521. Scopus Author ID: 7005152932

About the authors

Vladimir A. Evteev — Senior analyst of the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6150-5796. ResearcherID: E-1204-2017. eLIBRARY SPIN: 3347-0189. Scopus Author ID: 16230318000

Irina S. Semenova — Ph. D. in Biology, Chief Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9026-0508.

Natalya D. Bunyatyan — D. Sc. in Medicine, Professor, Leading Researcher of the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation; Head of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0936-5551. ResearcherID: D-3071-2018. eLIBRARY SPIN code: 9853-1232. Scopus Author ID: 6506018057

Aleksey B. Prokofiev — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation; Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7024-5546. ResearcherID: D-D-2961-2018. eLIBRARY SPIN code: 1003-0672. Scopus Author ID: 57189082881

Vladimir G. Kukes — D. Sc. in Medicine, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher of the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5112-6928. ResearcherID: D-3908-2018. eLIBRARY SPIN code: 8498-3521. Scopus Author ID: 7005152932

Изучение протективной активности препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный, на модели экспериментальной гриппозной пневмонии у лабораторных животных

В. В. ЗАРУБАЕВ¹, А. В. ГАРШИНИНА¹, Я. Л. ЕСАУЛКОВА¹, М. Г. МИХАЛЬСКИЙ¹, В. С. СМІРНОВ¹, *Т. А. КУДРЯВЦЕВА², С. В. ПЕТЛЕНКО³, В. А. ЗАПЛУТАНОВ⁴

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

⁴ АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия

Study of the Protective Activity of Thymogen® Dosed Nasal Spray on a Model of Experimental Influenza Pneumonia in Laboratory Animals

VLADIMIR V. ZARUBAEV¹, ANZHELIKA V. GARSHININA¹, YANA L. ESAULKOVA¹, MIKHAIL G. MIHALSKIY¹, VYACHESLAV S. SMIRNOV¹, *TATIANA A. KUDRYAVTSEVA², SERGEY V. PETLENKO³, VASILY A. ZAPLUTANOV⁴

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

³ Scientific and Clinical Center of Toxicology named after Academician S. N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Saint-Petersburg Institute of bioregulation and gerontology, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Введение. Из-за способности вируса гриппа мутировать необходимо осуществлять постоянный поиск новых лекарственных препаратов, обладающих профилактическим и прямым противовирусным действием. **Цель исследования** — изучение протективных противовирусных свойств препарата «Тимоген®», спрей назальный дозированный, на модели летальной гриппозной пневмонии у лабораторных животных. **Материал и методы.** Для эксперимента по изучению противовирусной активности тестируемых образцов лекарственных препаратов в отношении вируса гриппа H1N1 на белых половозрелых мышах были сформированы следующие группы (по 30 особей в каждой): две группы отрицательного контроля; две группы, получавшие Тимоген®, спрей (до и после заражения); одна группа животных, получавших Тамифлю®, и одна — Гексорал®. Оценивали летальность животных в ходе гриппозной пневмонии, а также проводили гистологический и морфометрический анализ. **Результаты и обсуждение.** Морфологическая картина лёгких животных коррелировала с их протективной активностью при анализе выживаемости животных. В наибольшей степени нормализация структуры ткани была выражена в группе животных, инфицированных вирусом, предварительно инкубированным с препаратом Тимоген®, спрей, назальный дозированный, и в группе с препаратом Тамифлю®. При этом в группе с препаратом Тимоген®, спрей вирусная нагрузка в лёгких была ниже на 1,5 и 1,2 порядка по сравнению с группой отрицательного контроля (3- и 6-е сутки опыта, соответственно), что соответствует снижению интенсивности вирусной репродукции в 31,6 и 15,8 раз.

Ключевые слова: Тимоген®; назальный спрей; грипп; противовирусное действие; вирусная пневмония; вирус гриппа; мыши; доклиническое исследование

Для цитирования: Зарубаев В. В., Гаршинина А. В., Есаулкова Я. Л., Михальский М. Г., Смирнов В. С., Кудрявцева Т. А., Петленко С. В., Заплутанов В. А. Изучение протективной активности препарата «Тимоген®», спрей назальный дозированный, на модели экспериментальной гриппозной пневмонии у лабораторных животных. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68 (9–10): 46–57. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-46-57>.

Abstract

Introduction. Due to the ability of the influenza virus to mutate, it is necessary to constantly search for new drugs with preventive and direct antiviral effects. **The aim of the study** is to investigate the protective antiviral properties of the drug Thy-

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Мира, д. 14, СПб НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г. Санкт-Петербург, Россия, 197101. E-mail: tatjana_ku@inbox.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 14 Mira st., Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, 197101 Russia. E-mail: tatjana_ku@inbox.ru

mogen®, a dosed nasal spray, on a model of lethal influenza pneumonia in laboratory animals. **Material and methods.** White mature mice were selected for the experiment on the antiviral activity of the tested drug samples against H1N1 influenza virus; the mice were divided into the following groups (30 animals each): two negative control groups; two groups receiving Thymogen®, a dosed nasal spray (before and after infection); one group of animals received Tamiflu®, and one received Hexoral®. The mortality of animals with influenza pneumonia was assessed; histological and morphometric analyses were also carried out. **Results and discussion.** The morphological picture of the lungs of animals correlated with their protective activity when analyzing the survival of animals. The normalization of tissue structure was pronounced the most in the group of animals infected with the virus, pre-incubated with Thymogen®, a dosed nasal spray, and in the group receiving Tamiflu®. Moreover, the viral load in the lungs was lower by 1.5 and 1.2 orders of magnitude in the group receiving Thymogen®, dosed nasal spray, compared to the negative control group (the 3rd and the 6th days of the experiment, respectively), which corresponds to a decrease in the intensity of viral reproduction by 31.6 and 15.8 times.

Keywords: Thymogen; nasal spray; influenza; antiviral effect; viral pneumonia, influenza virus; mice; preclinical study

For citation: Zarubaev V. V., Garshina A. V., Esaulkova Y. L., Mihalskij M. G., Smirnov V. S., Kudryavtseva T. A., Petlenko S. V., Zaplutanov V. A. Study of the protective activity of Thymogen® dosed nasal spray on a model of experimental influenza pneumonia in laboratory animals. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 46–57. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-46-57>.

Введение

Грипп является высококонтагиозным респираторным заболеванием человека. Ежегодно в мире регистрируется порядка 500 млн случаев заболевания, из которых около 2 млн заканчиваются летально. Грипп вызывает ежегодные эпидемии, а при резкой смене антигенного варианта вируса — пандемии, охватывающие все регионы Земли и приводящие к исключительно высоким показателям заболеваемости, госпитализации и смертности [1]. Наряду с сезонными подтипами вируса гриппа А (H1N1, H3N2), в человеческой популяции регистрируются вспышки заболеваемости, обусловленные вирусами подтипов H5N1, H7N7 и H7N9, проявляющими пандемические потенции благодаря отсутствию вакцин и иммунной прослойки населения, препятствующей распространению этих штаммов [2].

Для контроля гриппозной инфекции существуют препараты, относящиеся к четырём классам на основании различий в вирусной мишени и механизмах действия. Международно признанными являются производные адамантана (ремантадин и амантадин), блокирующие диссоциацию вирионов путём ингибирования активности вирусного протонного канала M2 [3]. Препараты второго поколения (осельтамивир, занамивир, ланинамивир и перамивир) блокируют вирусспецифический фермент нейраминидазу, препятствуя таким образом почкованию вирионов потомства от плазматической мембраны клетки [4–6]. Зарегистрированный в 2018 г. ингибитор вирусной эндонуклеазы — балоксавира марбоксил — препятствует процессам транскрипции вирусспецифической РНК в клетке [7]. Наконец, препарат умифеновир блокирует процесс слияния вирусной и клеточной мембран, связываясь с вирусспецифическим белком гемагглютинином [8].

Способность вируса гриппа к быстрой выработке лекарственной резистентности нивелирует противовирусную активность многих лекарственных препаратов. Это существенно снижает

эффективность противовирусной химиотерапии и придаёт особую актуальность разработке и внедрению новых средств профилактики и лечения гриппа, обладающих альтернативными механизмами активности и максимально широким спектром действия, в том числе за счёт его комплексного механизма действия. Ранее нами было показано противовирусное действие препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный, в отношении широкого спектра респираторных вирусов человека в экспериментах *in vitro* [9]. Учитывая, что подобный дизайн эксперимента не может дать полную информацию об эффективности клинического использования препарата, актуальной задачей является оценка протективной активности препарата в опытах на животных. В этом случае есть возможность зафиксировать не только прямые, но и опосредованные, в том числе через иммунную систему, эффекты препаратов.

Цель исследования — изучение протективных противовирусных свойств препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный, на модели летальной гриппозной пневмонии у лабораторных животных.

Материал и методы

Вирусы и клетки. В исследовании использовали вирус гриппа А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) из коллекции вирусных штаммов НИИЭМ им. Пастера. Вирус накапливали в клетках перmissive линии MDCK (ATCC CCL-34), делили на аликвоты и хранили при температуре –80°C до постановки соответствующих экспериментов.

Исследуемые препараты. В исследовании использовали альфа-глутамил-триптофан (Тимоген® спрей, назальный дозированный) производства АО «МБНПК «Цитомед» (Санкт-Петербург, Россия). В качестве препарата сравнения использовали осельтамивира фосфат (Тамифлю®, капсулы 75 мг, производства Hoffmann LaRoche, Швейцария) и гексэтидин — Гексорал®, аэрозоль для местного применения 0,2%, Делфарм Орлеан, Франция.

Лабораторные животные. Белых половозрелых мышей (самки) линии Balb/c массой 16–18 г (возраст 5–6 нед) получали из ООО «СМК СТЕЗАР» (Владимирская обл.). Содержание животных и манипуляции проводились в соответствии с «Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press (Washington, D. C. 1996).

В экспериментах по изучению противовирусной активности тестируемых образцов в отношении вируса гриппа H1N1 были сформированы следующие группы:

Группа 1 ($n=30$) — отрицательный контроль. Животные, инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в дозе 10^3 TCID₅₀ интраназально под эфирным наркозом в объёме 30 мкл и получавшие интраназально физиологический раствор (плацебо) в объёме 30 мкл в период 1–5 сут после инфицирования.

Группа 2 ($n=30$) — положительный контроль. Животные, инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в дозе 10^3 TCID₅₀ интраназально под эфирным наркозом в объёме 30 мкл и получающие препарат сравнения Тамифлю®, капсулы 75 мг, интрагастрально в объёме 200 мкл в дозе 25 мг/кг/сут в период 1–5 сут после инфицирования.

Группа 3 ($n=30$) — Тимоген®, спрей назальный, лечебно-профилактическая схема. Животные, инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в дозе 10^3 TCID₅₀ интраназально под эфирным наркозом в объёме 30 мкл и получающие Тимоген®, спрей, интраназально по лечебно-профилактической схеме в объёме 30 мкл в период 1–5 сут после инфицирования.

Группа 4 ($n=30$) — Гексорал®, аэрозоль. Животные, инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в дозе 10^3 TCID₅₀ интраназально под эфирным наркозом в объёме 30 мкл и получающие Гексорал®, аэрозоль, интраназально по лечебно-профилактической схеме в объёме 30 мкл в период 1–5 сут после инфицирования.

Группа 5 ($n=30$) — отрицательный контроль-2. Животные, инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в дозе 10^3 TCID₅₀ интраназально под эфирным наркозом в объёме 30 мкл и получающие физиологический раствор (плацебо) интрагастрально в объёме 200 мкл в период 1–5 сут после инфицирования.

Группа 6 ($n=30$) — Тимоген®, спрей назальный, вирулицидное действие. Животные, инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), предварительно инкубированным с препаратом Тимоген®, спрей, в течение 30 мин, в дозе 10^3 TCID₅₀ интраназально под эфирным наркозом в объёме 30 мкл.

В работе использовали две схемы применения препарата: вирулицидную и лечебно-профилактическую. При вирулицидной схеме применения вирус в дозе 10^3 TCID₅₀ предварительно инкубировали с препаратом Тимоген®, спрей, в течение 30 мин, после чего использовали для заражения животных. При лечебно-профилактической схеме применения препарата Тимоген®, спрей, вводили интраназально за 24 и за 3 ч до инфицирования и ежедневно раз в сутки в течение 5 дней после инфицирования животных.

Использование двух групп отрицательного контроля обусловлено особенностями интраназального применения профилактических и лечебных препаратов. Течение патологического процесса при гриппозной инфекции на фоне систематического интраназального введения жидкостей значительно отягощено по сравнению с группами инфицированных животных, получающих плацебо иными способами, и для достижения идентичных показателей гибели в первом случае требуется доза вируса приблизительно на 2 порядка меньше, чем во втором [10].

Животные были заражены вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в дозе 10^3 TCID₅₀ (группы 2, 5, 6) или 10^4 TCID₅₀ (группы 1, 3, 4) интраназально под эфирным наркозом в объёме 30 мкл. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней, то есть срока, в течение которого при экспериментальной гриппозной пневмонии отмечается летальность животных. Ежедневно учитывали летальность животных в контрольных и опытных группах. На основании полученных данных о смертности в каждой группе рассчитывали процент летальности (M) — отношение число павших за 14 дней животных к общему числу заражённых животных в группе; и индекс

защиты (IP) — отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе в соответствии со следующими формулами:

$$M=M/Nt,$$

где M — число животных в группе, павших в течение 14 дней после заражения; Nt — общее число животных в группе.

$$IP=(M_c-M_e)/M_c \times 100\%,$$

где M_c и M_e — летальность в процентах в контрольной и опытной группах, соответственно.

На 3-и и 6-е сутки после заражения была проведена эктаназия. Грудная клетка животных была вскрыта, и лёгкие 10 животных из каждой группы были изолированы. Лёгкие 5 животных были использованы для оценки вирусной нагрузки в ткани, оставшиеся 5 препаратов лёгких — для гистологического и морфометрического исследования.

Оценка вирусной нагрузки в ткани лёгких. Выделенные лёгкие были помещены в пробирки объёмом 2 мл. К ткани добавляли 9-кратное количество физиологического раствора, и затем готовили 10% гомогенаты при помощи автоматического гомогенизатора TissueLyser согласно инструкции производителя. Из каждого гомогената готовили серию 10-кратных разведений в среде для культивирования клеток MEM от 10^{-1} до 10^{-7} . Этими разведениями инфицировали клетки MDCK, предварительно рассеянные на 96-луночные планшеты для клеточных культур (NEST, Китай, кат. #701001). Планшеты инкубировали в течение 72 ч при 36°C и 5% CO₂. Наличие вируса определяли при помощи реакции гемагглютинации с 1% куриными эритроцитами. Для этого культуральную жидкость из лунок планшетов переносили в соответствующие лунки круглодонных планшетов (100 мкл на лунку), после чего к образцам добавляли по 100 мкл на лунку 1% суспензии куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Результаты гемагглютинации учитывали через 1 ч инкубации планшетов при 20°C. За инфекционный титр вируса принимали величину, обратную десятичному логарифму максимального разведения исходного материала, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации.

Гистологический и морфометрический анализ. Для морфологического исследования лёгкие фиксировали 10% формалином на фосфатном буфере, отмывали в проточной воде в течение ночи, дегидратировали в этаноле нарастающих концентраций, после чего обрабатывали хлороформом в течение 1 мин, заливали в парафин и готовили из полученных блоков срезы толщиной 4 мкм. Срезы освобождали от парафина ксилолом, регидратировали в этаноле убывающей концентрации, окрашивали гематоксилин-эозином, дифференцировали в подкисленном спирте, окончательно обезжировали в спиртах нарастающей концентрации, дважды обрабатывали ксилолом и заключали в балзам. Полученные препараты исследовали под микроскопом Leica DM1000. Качественно оценивали интенсивность и клеточный состав воспалительного инфильтрата в очагах пневмонии, а также степень дегенеративных и пролиферативных процессов в ткани лёгких.

Для количественной оценки степени выраженности патологических процессов в лёгких гистологические срезы были подвергнуты морфометрическому анализу при помощи программы анализа изображений ImageJ (NIH, США). В качестве оцениваемого параметра использовали долю площади среза, занятую клеточными элементами, что коррелирует с тяжестью процесса при пневмонии любой, в том числе, вирусной этиологии.

Анализ данных. Для всех данных были рассчитаны элементы описательной статистики, которые представлены в итоговых таблицах. Результаты представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SE$). Достоверность различий оценивали при помощи пакета программ GraphPad Prism (v.6.01). Достоверными считали различия между группами, если параметр p не превышал 0,05.

Результаты

Изучение противовирусной активности препаратов.

Влияние препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный, на динамику гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной пневмонии. На первом этапе опыта была изучена эффективность применения препарата Тимоген®, спрей назальный, дозированный как протективного средства при гриппозной пневмонии. Были исследованы две схемы применения препарата — интраназальная лечебно-профилактическая, а также вирулицидная, при которой перед инфицированием вирус был предварительно инкубирован с раствором препарата. Две группы отрицательного контроля были необходимы для обеспечения адекватного негативного контроля.

Известно, что при интраназальном и интра-трахеальном применении препаратов для лечения пневмонии их терапевтический эффект нивелируется, а зачастую полностью маскируется патологическими последствиями собственно интраназального применения препаратов. Это обусловлено тем, что систематическое поступление жидкости в дыхательные пути препятствует выводу вирусного потомства и продуктов клеточного распада, которые при обычном течении гриппа удаляются из организма при помощи механизмов мукоцилиарного клиренса. Это приводит к значительному возрастанию вирусной нагрузки, и для получения сопоставимых показателей тяжести процесса, в том числе смертности животных, требует инфицирующей дозы на 2–3 порядка меньшей, чем для модели с другими путями введения препаратов (внутривенным, оральным, внутрибрюшинным и др.).

В этой связи в нашей работе были использованы две негативные контрольные группы животных. Животные первой группы были инфицированы вирусом в дозе 10^3 TCID₅₀ и получали в качестве плацебо интраназально физиологический раствор в объеме 30 мкл. Эта группа животных служила контролем для экспериментальных групп, где животные получали препараты интраназально (3 и 4). Животные второй контрольной группы были заражены вирусом в дозе 10^3 TCID₅₀ и не получали интраназальных препаратов. Эта группа служила отрицательным контролем для группы 6, где животные были инфицированы той же дозой вируса, предварительно инкубированного с раствором препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный.

Результаты анализа динамики смертности животных в ходе гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), приведены в табл. 1 и для наглядности представлены на рис. 1, 2.

Как видно из представленных результатов, инфицирование вирусом гриппа приводило к гибели животных начиная с 6-х суток после заражения. К окончанию эксперимента летальность в обеих группах отрицательного контроля составила 90%. Использование препарата сравнения Тамифлю® приводило к достоверному снижению смертности животных на 89% по сравнению с группой плацебо (группа 5, $p=0,0004$), что говорит о корректности использованной модели.

Применение препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный, по лечебно-профилактической схеме также снижало специфическую смертность животных. Индекс защиты в этом случае со-

Таблица 1. Динамика гибели животных в ходе гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), в условиях применения лекарственных средств

Table 1. Dynamics of animal mortality during the course of influenza pneumonia caused by influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus under the conditions of treatment with medications

Группа опыта	Животных в группе	Смертность по дням после инфицирования							Смертность, %	Индекс защиты, %
		5	6	7	8	9	10	11		
Группа 1 Отрицательный контроль	10		1	3	2	1		2	90	—
Группа 2 Тамифлю	10				1				10	89
Группа 3 Тимоген (лечебно-профилактическая)	10			3		2			50	44
Группа 4 Гексорал	10	1	4	2			1		70	22
Группа 5 Отрицательный контроль-2	10		2	4	1	1	1		90	—
Группа 6 Тимоген (вирулицидная)	10				1	2	1		40	56

ставил 44% ($p=0,0806$). При этом препарат сравнения Гексорал®, аэрозоль, в аналогичных условиях снижал уровень смертности животных лишь на 22% ($p=0,8828$). Возможно, такая низкая активность препарата является следствием его более выраженного повреждающего действия в отношении клеток респираторного эпителия, что приводит к более выраженным последствиям гриппозной инфекции на поздних стадиях её развития.

В то же время предварительная инкубация вируса с препаратом Тимоген®, спрей назальный дозированный, приводила к достоверному снижению инфекционной активности вируса, что выражалось в достоверном снижении смертности животных по сравнению с соответствующей группой отрицательного контроля (индекс защиты 56%, $p=0,0042$). Полученные данные свидетельствуют, что препарат Тимоген®, спрей назальный дозированный, при различных вариантах применения является эффективным средством профилактики гриппозной инфекции, снижая инфекционную активность вируса при совместной предварительной инкубации.

Оценка вирусной нагрузки в ткани лёгких.

Полученные данные были подтверждены при анализе вирусной нагрузки в ткани лёгких инфицированных животных. Результаты изучения уровня репродукции вируса в ткани лёгких суммированы в табл. 2 и проиллюстрированы на рис. 3, 4.

Как видно из представленных результатов, вирус гриппа эффективно реплицировался в лёгких лабораторных животных, достигая к 3-м суткам титра $5,9 \lg \text{TCID}_{50}/0,2 \text{ мл}$. С течением времени инфекционный титр вируса снижался и на 6-е сутки инфекции составлял $3,6 \lg \text{TCID}_{50}/0,2 \text{ мл}$. Применение референс-препарата Тамифлю® приводило к подавлению вирусной репродукции на 2,1 и 1,1 порядка на 3-и и 6-е сутки, соответственно, что соответствует примерно 126- и 13-кратному снижению интенсивности вирусной продукции.

Использование изучаемых препаратов влияло на уровень репродукции вируса гриппа в ткани лёгких в разной степени. Так, наиболее

достоверное снижение инфекционной активности вируса отмечалось в группе животных, инфицированных вирусом, предварительно инкубированным с препаратом Тимоген®, спрей назальный дозированный. В этом случае вирусная нагрузка в лёгких была ниже на 1,5 и 1,2 порядка по сравнению с группой отрицательного контроля (3-и и 6-е сутки опыта, соответственно), что соответствует снижению интенсивности вирусной репродукции в 31,6 и 15,8 раз. В то же время интраназальное применение как препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный, так и препарата сравнения Гексорал® не приводило к статистически достоверному снижению вирусного титра в ткани лёгких инфицированных животных.

Гистологическое исследование ткани лёгких.

Полученные данные были подтверждены при помощи морфологического анализа ткани лёгких животных экспериментальных групп. Так, лёгкие интактных животных выглядели воздушными, просветы трахеи и бронхов были свободны от клеточного дебриса и клеток воспалительного инфильтрата, межалвеолярные перегородки не были утолщены, а сами альвеолы были свободны от экссудата и клеток воспаления (рис. 5).

Инфицирование животных вирусом гриппа приводило к развитию отёка лёгких, сопровождающегося появлением воспалительного экссудата в просветах бронхов, деструкцией бронхиального эпителия, значительным утолщением межалвеолярных перегородок, сокращением воздухообменного объёма альвеол, отёком интерстициальной ткани и формированием очагов воспалительной инфильтрации в лёгких. В ряде случаев просветы бронхов и альвеолярные полости полностью заполнялись клетками воспалительного экссудата, образуя очаги карнификации (рис. 6, 7).

Применение изучаемых препаратов влияло на морфологические показатели патологического процесса при гриппозной пневмонии в различной степени. Так, в группе животных, получавших препарат сравнения Тамифлю®, отмечалась нор-

Таблица 2. Репродукция вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в лёгких лабораторных животных в условиях применения лекарственных средств

Table 2. Reproduction of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus in the lungs of laboratory animals under the drug treatment conditions

Препарат	Титр вируса ($\lg \text{TCID}_{50}/0,2 \text{ мл}$)*		p (KB)**	
	3 сут	6 сут	3 сут	6 сут
Группа 1 Отрицательный контроль	$5,9 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,2$	1,0000	1,0000
Группа 2 Тамифлю	$3,8 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$	0,0079	0,0317
Группа 3 Тимоген (лечебно-профилактическая)	$5,0 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$	0,0714	0,1032
Группа 4 Гексорал	$4,9 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,2$	0,1429	0,1905
Группа 5 Отрицательный контроль-2	$6,2 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,2$	1,0000	1,0000
Группа 6 Тимоген (вирулицидная)	$4,7 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,2$	0,0159	0,0238

Примечание. KB — контроль вируса; * — $M \pm SE$; ** — значение p при сравнении по критерию Манна–Уитни с соответствующей группой плацебо.

Note. KB — virus control; * — $M \pm SE$; ** — P value when compared with the corresponding placebo group using the Mann–Whitney test.

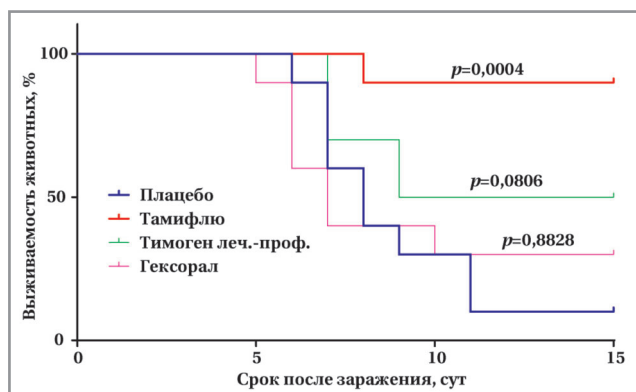


Рис. 1. Влияние лекарственных веществ, в том числе и при интраназальном применении, на динамику гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), у белых мышей.

Fig. 1. The influence of medications, including intranasal use, on the dynamics of animal mortality during experimental influenza pneumonia caused by the influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus in white mice.

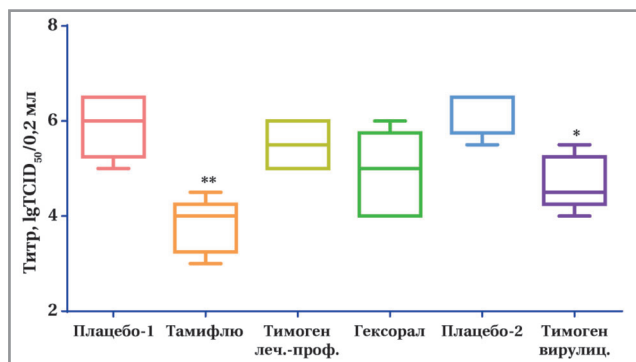


Рис. 3. Инфекционная активность вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в ткани лёгких животных на 3-и сутки после инфицирования в условиях применения лекарственных препаратов.

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Fig. 3. Infectious activity of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus in animal lung tissue on the 3rd day after infection under the drug treatment conditions.

Note. * — $P < 0.05$; ** — $P < 0.01$.

мализация гистологической структуры ткани. Это выражалось в снижении степени экссудативных и инфильтративных процессов в ткани, уменьшении толщины межальвеолярных перегородок и повышении объёма воздухообменной зоны в респираторных отделах (рис. 8).

Морфологическая картина лёгких животных, получавших изучаемые препараты, коррелировала с их протективной активностью при анализе выживаемости животных. Так, в наибольшей степени нормализация структуры ткани была выражена в группе животных, инфицированных вирусом, предварительно инкубированным с препаратом Тимоген®, спрей назальный дозированный. В этом случае отмечалось снижение уровня отёка и вос-

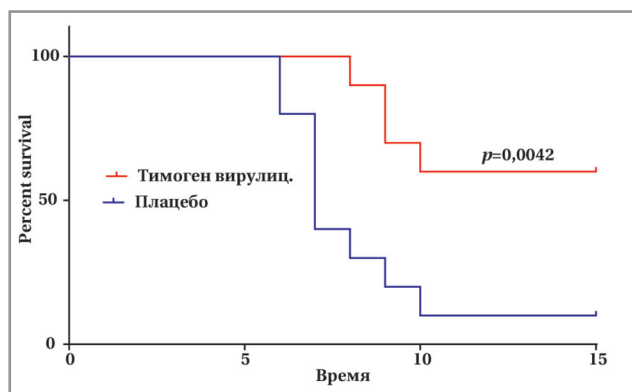


Рис. 2. Влияние препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный, на динамику гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), у белых мышей, в условиях предварительной инкубации вируса с препаратом.

Fig. 2. The effect of the drug Thymogen®, dosed nasal spray, on the dynamics of animal mortality during experimental influenza pneumonia caused by the influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus in white mice, under the conditions of preliminary incubation of the virus with the drug.

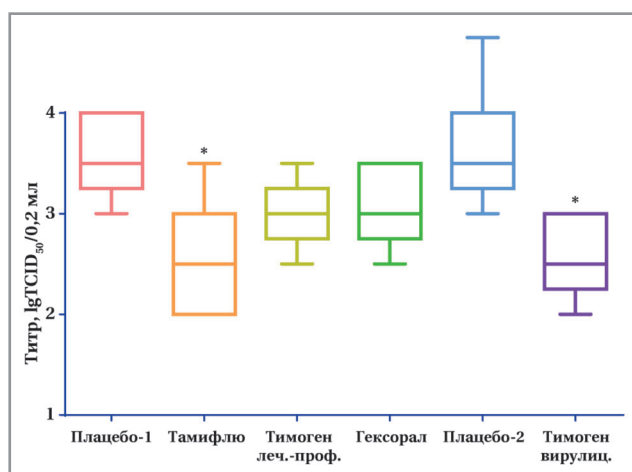


Рис. 4. Инфекционная активность вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в ткани лёгких животных на 3-и сутки после инфицирования в условиях применения лекарственных препаратов.

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Fig. 4. Infectious activity of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus in animal lung tissue on the 6th day after infection under the drug treatment conditions.

Note. * — $P < 0.05$.

палительной инфильтрации лёгких, повышение степени воздушности ткани и уменьшение периваскулярных и перибронхиальных инфильтратов в лёгких (рис. 9).

Лёгкие животных, получавших интраназально Гексорал®, аэрозоль и препарат Тимоген®, спрей назальный дозированный, визуально были сходны с лёгкими животных из группы отрицательного контроля 1. Как и в контрольной группе, в них отмечались признаки отёка лёгких, сопровождаю-

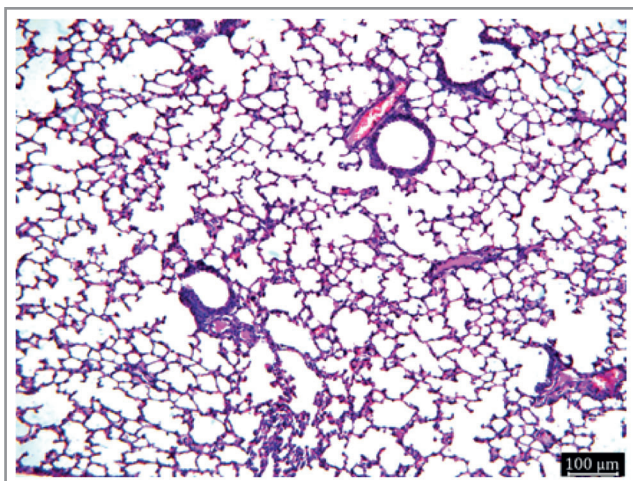


Рис. 5. Структура ткани лёгких intactной мыши.
Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 5. Structure of the lung tissue of an intact mouse.
Note. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

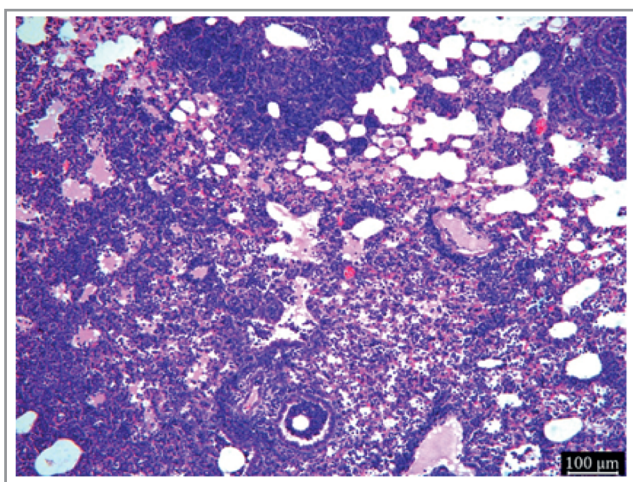


Рис. 6. Лёгкие мышей на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа.

Отёк и воспалительная инфильтрация интерстиция, серозный экссудат в альвеолах. Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 6. Lungs of mice on the 3rd day after infection with influenza virus.

Note. Edema and inflammatory infiltration of the interstitium, serous exudate in the alveoli. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

щегося появлением воспалительного экссудата в просветах бронхов, деструкцией бронхиального эпителия, значительным утолщением межальвеолярных перегородок, сокращением воздухообменного объёма альвеол, отёком интерстициальной ткани и формированием очагов воспалительной инфильтрации в лёгких (рис. 10, 11).

На 6-е сутки после заражения в структуре лёгких экспериментальных животных прослеживались те же тенденции, что и на сроке 3 сут. Во всех случаях отмечалась структурная организация очагов воспаления, проявляющаяся регенера-

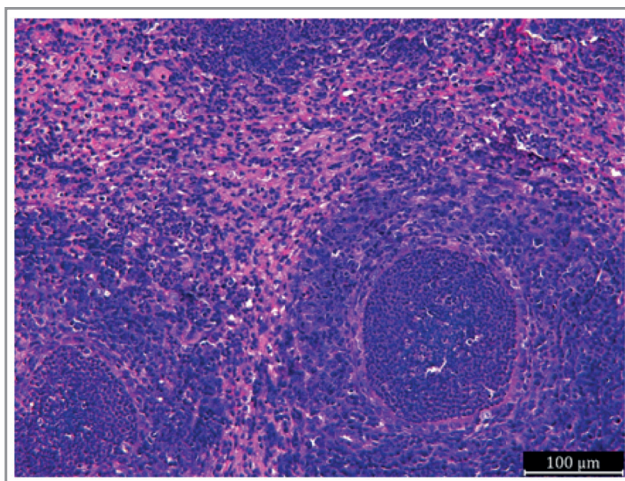


Рис. 7. Очаг карнификации в лёгком мыши на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа.

Гематоксилин-эозин, ув. $\times 200$.

Fig. 7. Carnification locus in the lung of a mouse on the 3rd day after infection with the influenza virus.

Note. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 200$.

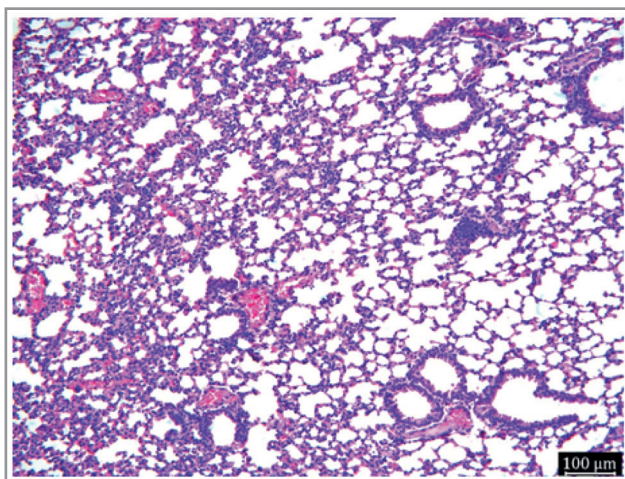


Рис. 8. Лёгкие мышей на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в условиях применения Тамифлю®.

Умеренный отёк и воспалительная инфильтрация интерстиция, незначительные периваскулярные и перибронхиальные инфильтраты. Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 8. Lungs of mice on the 3rd day after infection with influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus under the conditions of treatment with Tamiflu®.

Note. Moderate edema and inflammatory infiltration of the interstitium, minor perivascular and peribronchial infiltrates. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$

тивными процессами, выраженной инфильтрацией полиморфноядерными клеточными элементами и чётким отграничением пораженных участков от intactной ткани (рис. 12).

Описанные патологические изменения были выражены в гораздо меньшей степени в группе животных, инфицированных вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), получавших проти-

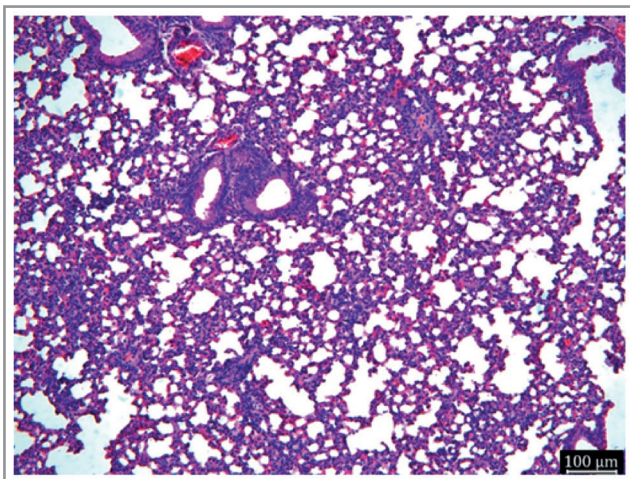


Рис. 9. Лёгкие мышей на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), предварительно инкубированным с препаратом Тимоген®, спрей назальный дозированный.

Умеренный отёк и воспалительная инфильтрация интерстиция, незначительные периваскулярные и перибронхиальные инфильтраты. Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 9. Lungs of mice on the 3rd day after infection with influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus, pre-incubated with Thymogen®, dosed nasal spray.

Note. Moderate edema and inflammatory infiltration of the interstitium, minor perivascular and peribronchial infiltrates. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

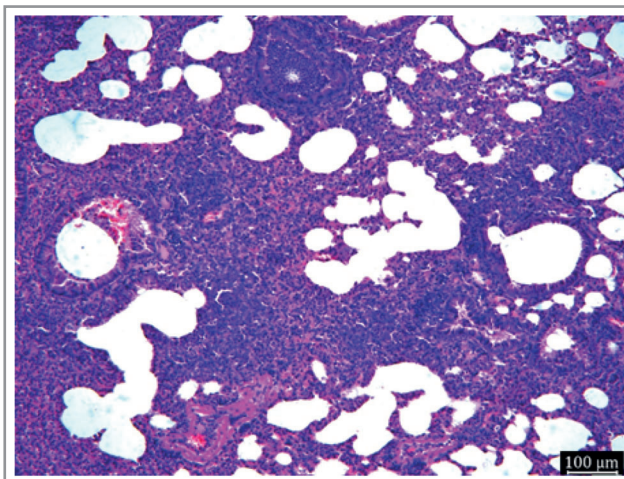


Рис. 11. Лёгкие мыши на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа в условиях интраназального применения препарата Гексорал®.

Отёк и воспалительная инфильтрация интерстиция, серозный экссудат в альвеолах. Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 11. Lungs of mice on the 3rd day after infection with influenza virus under the conditions of intranasal use of Hexoral®.

Note. Edema and inflammatory infiltration of the interstitium, serous exudate in the alveoli. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

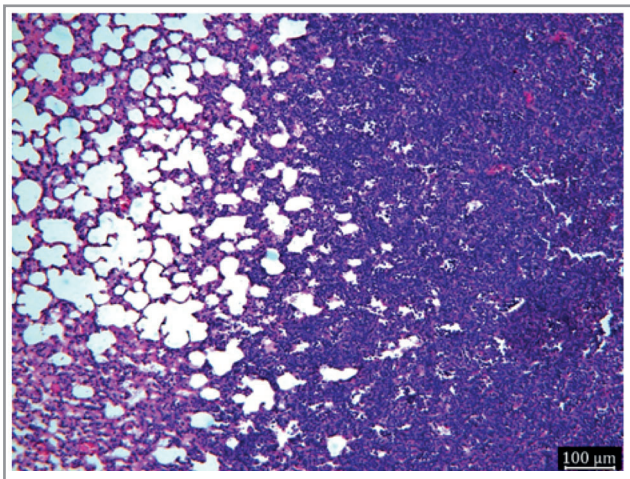


Рис. 10. Лёгкие мышей на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа в условиях интраназального применения препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный.

Отёк и воспалительная инфильтрация интерстиция, серозный экссудат в альвеолах. Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 10. Lungs of mice on the 3rd day after infection with the influenza virus under the conditions of intranasal use of Thymogen®, dosed nasal spray.

Note. Edema and inflammatory infiltration of the interstitium, serous exudate in the alveoli. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

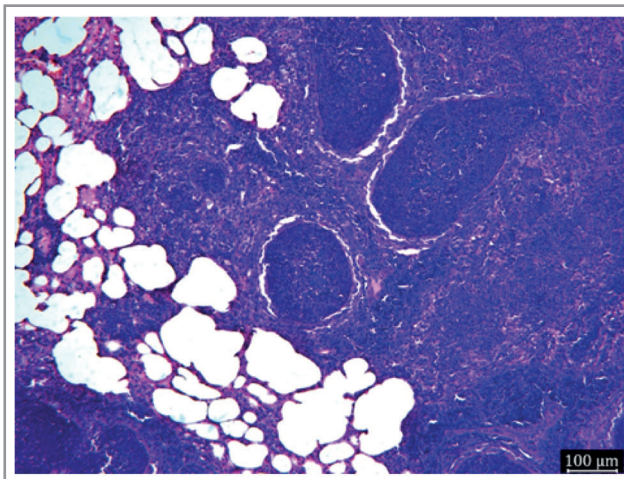


Рис. 12. Лёгкие мышей на 6-е сутки после инфицирования вирусом гриппа.

Отёк и нейтрофильная инфильтрация интерстиция, серозный экссудат в альвеолах. Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 12. Lungs of mice on the 6th day after infection with influenza virus.

Note. Edema and neutrophilic infiltration of the interstitium, serous exudate in the alveoli. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

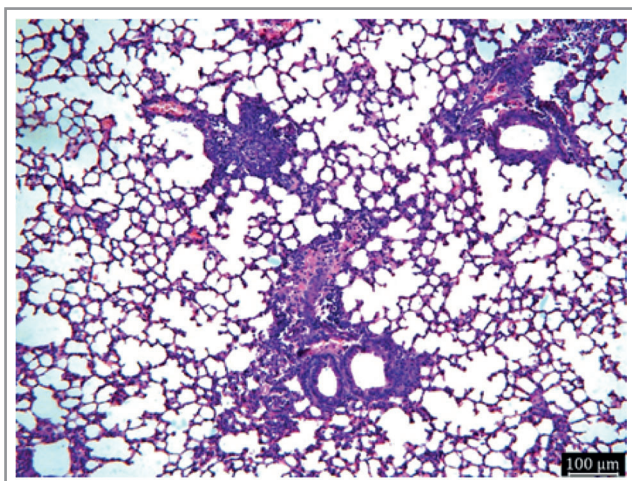


Рис. 13. Лёгкие мыши на 6-е сутки после инфицирования вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в условиях применения Тамифлю®.

Умеренный отёк и воспалительная инфильтрация интерстиция, незначительные периваскулярные и перибронхиальные инфильтраты. Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 13. Lungs of mice on the 6th day after infection with influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus under the conditions of Tamiflu® use.

Note. Moderate edema and inflammatory infiltration of the interstitium, minor perivascular and peribronchial infiltrates. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

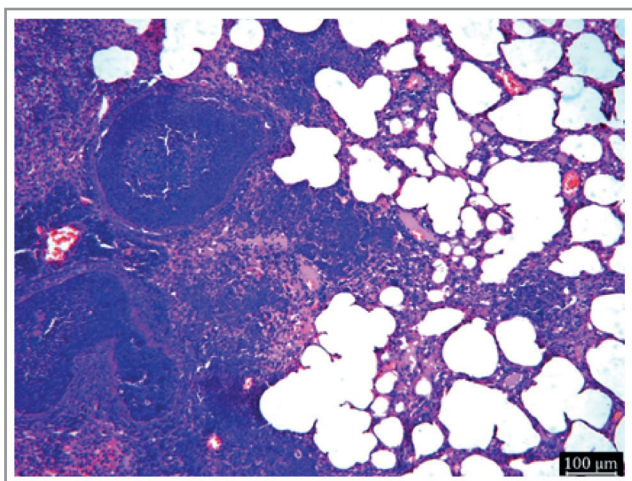


Рис. 14. Лёгкие мышей на 6-е сутки после инфицирования вирусом гриппа в условиях интраназального применения препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный.

Отёк и воспалительная инфильтрация интерстиция, клеточный дебрис и нейтрофильный экссудат в просветах бронхов. Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 14. Lungs of mice on the 6th day after infection with the influenza virus under the conditions of intranasal use of the drug Thymogen®, dosed nasal spray.

Note. Edema and inflammatory infiltration of the interstitium, cellular debris and neutrophilic exudate in the lumens of the bronchi. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

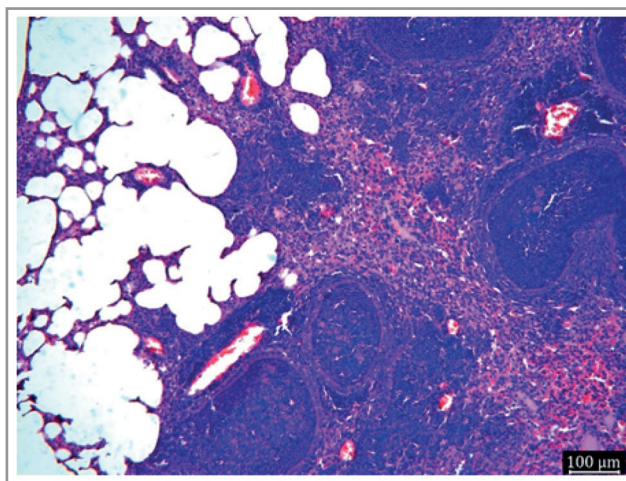


Рис. 15. Лёгкие мыши на 6-е сутки после инфицирования вирусом гриппа в условиях интраназального применения препарата Гексорал®.

Отёк и воспалительная инфильтрация интерстиция, обильный клеточный дебрис и нейтрофильный экссудат в просветах бронхов. Гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$.

Fig. 15. Lungs of mice on the 6th day after infection with influenza virus under the conditions of intranasal use of Hexoral®.

Note. Edema and inflammatory infiltration of the interstitium, abundant cellular debris and neutrophilic exudate in the lumens of the bronchi. Hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

вогриппозный препарат Тамифлю®, а также в группе животных, инфицированных вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34, предварительно инкубированным с препаратом Тимоген®, спрей назальный дозированный. Отмечалось существенное снижение степени экссудативных и инфильтративных процессов в ткани, уменьшение толщины межальвеолярных перегородок и повышение объёма воздухообменной зоны в респираторных отделах (рис. 13).

Лёгкие животных, получавших интраназально Гексорал® аэрозоль и препарат Тимоген®, спрей назальный дозированный, визуально были сходны с лёгкими животных из группы отрицательного контроля. Как и в контрольной группе, в них отмечались признаки отёка лёгких, сопровождающегося присутствием обильного воспалительного экссудата в просветах бронхов, значительным утолщением межальвеолярных перегородок, сокращением воздухообменного объёма альвеол, отёком интерстициальной ткани и формированием очагов воспалительной инфильтрации в лёгких (рис. 14, 15).

Количественная оценка степени отёка лёгких при помощи морфометрического анализа. Для количественной оценки степени отёка лёгких гистологические срезы были подвергнуты морфометрическому анализу при помощи программы анализа изображений ImageJ (НИН, США). В качестве оцениваемого параметра использовали долю площади среза, занятую клеточными элементами, что

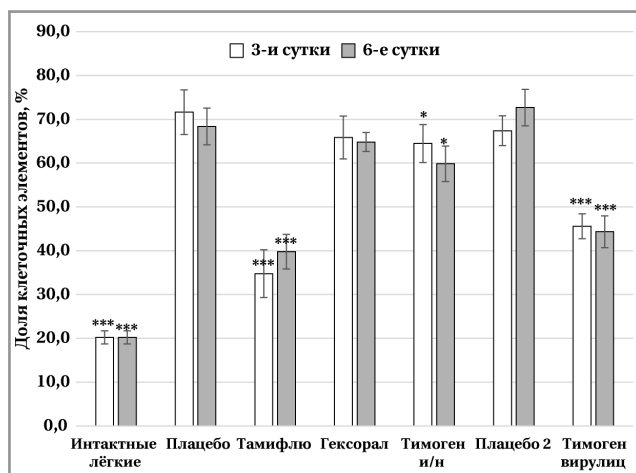


Рис. 16. Протективная активность лекарственных препаратов на модели гриппозной пневмонии у белых мышей.

* — $p < 0,05$; *** — $p < 0,0001$ при сравнении с группой плацебо.

Fig. 16. Protective activity of drugs in a model of influenza pneumonia in white mice.

Note. * — $P < 0.05$; *** — $P < 0.0001$ when compared with the placebo group.

коррелирует с тяжестью процесса. Результаты морфометрического анализа суммированы в табл. 3 и для наглядности представлены на рис. 16.

Как видно из представленных результатов, репликация вируса гриппа в лёгких лабораторных животных в условиях интраназального применения препаратов приводила к достоверному снижению воздухообменного пространства в лёгких

с 79,8 до 28,4 и 31,6% на 3-и и 6-е сутки, соответственно ($p < 0,0001$ для обоих сроков). В группах, где препараты не вводили животным интраназально (группы 3, 5 и 6) воздухообменный объём лёгких сокращался с 79,8 до 32,6 и 27,3% на 3-и и 6-е сутки, соответственно ($p < 0,0001$ на обоих сроках). Применение препарата сравнения Тамифлю® приводило к достоверному повышению этого показателя до 65,2 и 60,2%, на 3-и и 6-е сутки, соответственно ($p < 0,0001$ для обоих сроков).

Изучаемые препараты также в некоторой степени снижали степень отёка и воспалительной клеточной инфильтрации ткани лёгких. В наибольшей степени это было выражено в группе животных, инфицированных вирусом, предварительно инкубированным с препаратом Тимоген®, спрей назальный дозированный. В этой группе воздушность ткани лёгких повышалась с 32,6 до 54,4% и с 27,3 до 55,7% на 3-и и 6-е сутки, соответственно ($p < 0,0001$ для обоих сроков).

Интраназальное применение препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный, приводило к статистически достоверному снижению степени отёка лёгких при гриппозной инфекции. В этой группе воздушность ткани лёгких повышалась с 28,4 до 35,5% и с 31,6 до 40,1% на 3-и и 6-е сутки, соответственно ($p = 0,0453$ и $0,0114$, соответственно). В то же время интраназальное использование препарата сравнения Гексорал® не приводило к статистически значимым изменениям морфометрических показателей гриппозной пневмонии.

Таблица 3. Степень отёка и клеточной инфильтрации лёгких белых мышей при инфицировании вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в условиях применения противовирусных препаратов

Table 3. The degree of edema and cellular infiltration of the lungs of white mice during infection with the influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus under the conditions of treatment with antiviral drugs

Препарат	3-и сутки			6-е сутки		
	Доля клеточных элементов, %	Доля свободного пространства лёгких, %	p (KB)*	Доля клеточных элементов, %	Доля свободного пространства лёгких, %	p (KB)*
Интактные животные	20,2±1,5	79,8±1,5	<0,0001	20,2±1,5	79,8±1,5	<0,0001
Группа 1						
Отрицательный контроль	71,6±5,1	28,4±5,1	1,0000	68,4±4,2	31,6±4,2	1,0000
Группа 2						
Тамифлю	34,8±5,4	65,2±5,4	<0,0001	39,8±4,0	60,2±4,0	<0,0001
Группа 3						
Тимоген (леч./проф.)	64,5±4,3	35,5±4,3	0,0453	59,9±4,0	40,1±4,0	0,0114
Группа 4						
Гексорал	65,9±4,9	34,1±4,9	0,1062	64,8±2,2	35,2±2,2	0,1428
Группа 5						
Отрицательный контроль-2	67,4±3,4	32,6±3,4	1,0000	72,7±4,2	27,3±4,2	1,0000
Группа 6						
Тимоген (вирулицид.)	45,6±2,9	54,4±2,9	<0,0001	44,3±3,6	55,7±3,6	<0,0001

Примечание. KB — контроль вируса; * — значение p при сравнении при помощи критерия Стьюдента с группой плацебо (группа 2) для групп интактных животных, групп 3 и 4. Значение p при сравнении при помощи критерия Стьюдента с группой плацебо-2 для групп 2 и 6.

Note. KB — virus control; * — P value of groups of intact animals, groups 3 and 4, when compared with the placebo group (group 2) using Student's t -test. P value of groups 2 and 6 when compared with placebo-2 group using Student's t -test.

Обсуждение

В настоящем исследовании показано протективное действие препарата Тимоген®, спрей назальный дозированный, при гриппозной инфекции в экспериментах *in vivo*. Применение препарата по лечебно-профилактической схеме снижало специфическую смертность животных. Индекс защиты в этом случае составил 44%. Предварительная инкубация вируса с препаратом также приводила к снижению смертности животных по сравнению с соответствующей группой отрицательного контроля (индекс защиты 56%). В этой группе животных вирусная нагрузка в лёгких была ниже на 1,5 и 1,2 порядка по сравнению с группой отрицательного контроля (3-и и 6-е сутки опыта, соответственно), что соответствует снижению интенсивности вирусной репродукции в 31,6 и 15,8 раз. Отмечалась также нормализация морфологической структуры ткани лёгких и снижение степени воспалительной инфильтрации и отёка, что подтверждалось данными морфометрического анализа.

Таким образом, комплексное воздействие на звенья патогенеза гриппозной инфекции [9–11] позволяет рассматривать Тимоген®, спрей назальный дозированный, как перспективный препарат для профилактики и контроля гриппозной инфекции при местном применении.

Литература/References

1. Viasus D., Revuelta J.A.O., Martinez-Montauti J., Carratala J. Influenza A(H1N1)pdm09-related pneumonia and other complications. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2012; 4: 43–48. doi: 10.1016/S0213-005X(12)70104-0.
2. Philippon D.A.M., Wu P., Cowling B.J., Lau E.H.Y. Avian Influenza Human Infections at the Human-Animal Interface. *J Infect Dis*. 2020; 222 (4): 528–537. doi: 10.1093/infdis/jiaa105.
3. Bright R.A., Shay D.K., Shu B., Cox N.J., Klimov A.I. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA*. 2006; 295 (8): 891–894. doi: 10.1001/jama.295.8.joc60020.
4. Feng E., Ye D., Li J., Zhang D., Wang J., Zhao E., Hilgenfeld R., Zheng M., Jiang H., Liu H. Recent advances in neuraminidase inhibitor development as anti-influenza drugs. *ChemMedChem*. 2012; 7 (9): 1527–1536. doi: 10.1002/cmdc.201200155.
5. Scott L.J. Peramivir: A review in uncomplicated influenza. *Drugs*. 2018; 78 (13): 1363–1370. doi: 10.1007/s40265-018-0981-8.
6. Kashiwagi S., Yoshida S., Yamaguchi H., Niwa S., Mitsui N., Tanigawa M., Shiosakai K., Yamanouchi N., Shiozawa T., Yamaguchi F. Safety of the long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate hydrate in post-marketing surveillance. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40 (5): 381–388. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.06.017.
7. Hayden F.G., Sugaya N., Hirotsu N., Lee N., de Jong M.D., Hurt A.C., Ishida T., Sekino H., Yamada K., Portsmouth S. et al. Baloxavir marboxil

Информация об авторах

Зарубаев Владимир Викторович — д. б. н., заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5224-3771. Researcher ID: H-1534-2018. eLIBRARY SPIN-код: 7030-1541. Scopus Author ID: 6602439930

Гаршинина Анжелика Валерьевна — старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия. Researcher ID: 36469952700. eLIBRARY SPIN-код: 9992-1424. AuthorID: 1001224. Scopus AuthorID: 36469952700

Дополнительная информация

Участие авторов. В. В. Зарубаев — дизайн и проведение исследования, написание публикации, статистическая обработка; А. В. Гаршинина — проведение исследования, редактирование публикации; Я. Л. Есаулкова — проведение исследования, редактирование публикации; М. Г. Михальский — проведение исследования, редактирование публикации; В. С. Смирнов — дизайн исследования, редактирование публикации; Т. А. Кудрявцева — дизайн исследования, статистическая обработка, написание публикации; С. В. Петленко — дизайн исследования, редактирование публикации; В. А. Заплутанов — дизайн исследования, написание публикации.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы в ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» (г. Санкт-Петербург, РФ) по заказу и финансовой поддержке АО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед» (г. Санкт-Петербург, РФ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

- for uncomplicated influenza in adults and adolescents. *N Engl J Med*. 2018; 379 (10): 913–923. doi: 10.1056/NEJMoa1716197.
8. Blaising J., Polyak S.J., Pecheur E.I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral Res*. 2014; 107: 84–94. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.04.006.
9. Зарубаев В.В., Смирнов В.С., Кудрявцева Т.А., Петленко С.В., Слута А.В., Мин Х., Заплутанов В.А. Изучение механизма противовирусной активности препарата Цитовир®-3 в отношении респираторных вирусов *in vitro*. Антибиотики и химиотер. 2023; 68 (3–4): 4–10. doi: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-4-10. [Zarubaev V. V., Smirnov V. S., Kudryavtseva T. A., Petlenko S. V., Slita A. V., Minh H., Zaplutanov V. A. Study of the mechanism of antiviral activity of Cytovir-3 against respiratory viruses *in vitro*. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. doi: https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-4-10. (in Russian)]
10. Smeets D.E., von Itzstein M., Bhatt B., Tarbet E.B. Exacerbation of influenza virus infections in mice by intranasal treatments and implications for evaluation of antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (12): 6328–6333. doi: 10.1128/AAC.01664-12.
11. Golovacheva E.G., Starikova E.A., Kudryavtseva T.A., Apryatina V.A. The effect of drugs with α -glutamyl-tryptophan for cytokine secretion and level of surface molecule icam-1 *in vitro*. *Cell tissue biol*. 2023; 17 (2): 146–152. doi: 10.1134/S1990519X23020050.

About the authors

Vladimir V. Zarubaev — D. Sc. in Biology, Head of the Laboratory of Experimental Virology, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia ORCID ID: 0000-0002-5224-3771. Researcher ID: H-1534-2018. eLIBRARY SPIN-код: 7030-1541. Scopus Author ID: 6602439930

Anzhelika V. Garshinina — Senior Researcher at the Laboratory of Experimental Virology, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia. Researcher ID: 36469952700. eLIBRARY SPIN-код: 9992-1424. AuthorID: 1001224. Scopus AuthorID: 36469952700

Есаулкова Яна Леонидовна — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-3645-8342. Researcher ID: ABC-8028-2020. eLIBRARY SPIN-код: 6725-9435. AuthorID: 1097313. Scopus AuthorID: 57201794409

Михальский Михаил Геннадьевич — студент I курса магистратуры СПбГУ по направлению биология; препаратор лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0009-0009-1784-2611. Researcher ID: JMQ-7401-2023

Смирнов Вячеслав Сергеевич — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2723-1496. Researcher ID: T-9205-2017. eLIBRARY SPIN-код: 6276-2918. Scopus Author ID: 5719865301

Кудрявцева Татьяна Анатольевна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории нанотехнологии и синтеза лекарственных веществ отдела нейрофармакологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-4997-9830. Researcher ID: HLH-6614-2023. eLIBRARY SPIN-код: 6902-3750. Scopus Author ID: 57222550468

Петленко Сергей Викторович — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2752-4598. Researcher ID: ABC-6263-2022. eLIBRARY SPIN-код: 407034. Scopus Author ID: 6508391789

Заплутанов Василий Андреевич — научный сотрудник лаборатории пептидов, Автономная некоммерческая организация научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0001-5294-6533. Researcher ID: F-1215-2015. eLIBRARY SPIN-код: 6067-5480. Scopus Author ID: 55312771400

Yana L. Esaulkova — Junior Researcher at the Laboratory of Experimental Virology, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-3645-8342. Researcher ID: ABC-8028-2020. eLIBRARY SPIN-код: 6725-9435. AuthorID: 1097313. Scopus AuthorID: 57201794409

Mikhail G. Mihalskij — first-year master's student, preparator at the Laboratory of Experimental Virology, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia. ORCID ID: 0009-0009-1784-2611. Researcher ID: JMQ-7401-2023

Vyacheslav S. Smirnov — D. Sc. in Medicine, Professor, Leading Researcher at the Laboratory of Molecular Immunology, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2723-1496. Researcher ID: T-9205-2017. eLIBRARY SPIN-код: 6276-2918. Scopus Author ID: 5719865301

Tatiana A. Kudryavtseva — Ph. D. in Biology, research scientist, researcher at the Laboratory of Nanotechnology and Synthesis of Medicinal Substances, Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-4997-9830. Researcher ID: HLH-6614-2023. eLIBRARY SPIN-код: 6902-3750. Scopus Author ID: 57222550468

Sergey V. Petlenko — D. Sc. in Medicine, Leading Researcher at the Laboratory of Biochemical Toxicology and Pharmacology, Scientific and Clinical Center of Toxicology named after Academician S. N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2752-4598. Researcher ID: ABC-6263-2022. eLIBRARY SPIN-код: 407034. Scopus Author ID: 6508391789

Vasiliy A. Zaplutanov — Senior Researcher at the Laboratory of Pharmacology of Peptides, Saint-Petersburg Institute of bioregulation and gerontology, Saint-Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0001-5294-6533. Researcher ID: F-1215-2015. eLIBRARY SPIN-код: 6067-5480. Scopus Author ID: 55312771400

Изучение противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной кожной раны

Г. Н. ГЕНАТУЛЛИНА

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

Study of the Antimicrobial Activity of Staphylococcal Bacteriophage on a Model of an Infected Skin Wound

GUZEL N. GENATULLINA

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

Резюме

Цель исследования — изучение противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной *Staphylococcus aureus* кожной раны. Изучение противомикробной активности проводили в условиях *in vivo* путём экспериментального моделирования инфицированной *Staphylococcus aureus* кожной раны в межлопаточной области у нелинейных крыс-самцов. Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с требованиями нормативной документации, регламентирующей содержание лабораторных животных и работу с ними. Полученные результаты свидетельствуют о выраженной противомикробной активности стафилококкового бактериофага в условиях раневой инфекции при наружном его применении, что подтверждается снижением степени бактериальной обсеменённости отделяемого ран, а также уменьшении воспалительных явлений как на локальном уровне в виде снижения гиперемии, так и генерализованном — в виде снижения уровня С-реактивного белка, общего количества лейкоцитов, а также уменьшения лейкоцитарного индекса воспаления. Выявленный противомикробный эффект сопоставим с наружным применением антисептического препарата — раствора хлоргексидина биглюконата 0,05%, однако при оценке микробной обсеменённости было установлено, что бактериофаг проявляет более выраженную антибактериальную активность. Таким образом, стафилококковый бактериофаг на модели инфицированной *S. aureus* кожной раны проявил выраженную противомикробную активность, подтверждённую уменьшением количества колоний микроорганизма в отделяемом раны, а также снижением выраженности степени воспаления.

Ключевые слова: бактериофаг; *Staphylococcus aureus*; инфицированная кожная рана; противомикробная активность

Для цитирования: Генатуллина Г. Н. Изучение противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной кожной раны. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68 (9–10): 58–62. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-58-62>.

Abstract

The purpose of this study was to investigate the antimicrobial activity of staphylococcal bacteriophage on a model of a skin wound infected with *Staphylococcus aureus*. The study of antimicrobial activity was carried out *in vivo* by experimental modeling of a skin wound infected with *S. aureus* in the interscapular region in nonlinear male rats. All manipulations with animals were performed in accordance with the requirements of regulatory documentation overseeing the management of laboratory animals and work with them. The results obtained indicate the pronounced antimicrobial activity of staphylococcal bacteriophage in conditions of wound infection when applied externally, which is confirmed by a decrease in the degree of bacterial contamination of wound discharge, as well as a decrease in inflammatory phenomena, both at the local level in the form of a decrease in hyperemia, and generalized in the form of a decrease in C-reactive protein levels, total leukocyte count, as well as a decrease in the leukocyte inflammatory index. The identified antimicrobial effect is comparable to the external use of an antiseptic drug — a solution of chlorhexidine digluconate 0.05%, however, when assessing microbial contamination, it was found that the bacteriophage exhibits more pronounced antibacterial activity. Thus, the staphylococcal bacteriophage showed pronounced antimicrobial activity in a model of a skin wound infected with *S. aureus*, confirmed by a decrease in the number of colonies of the microorganism in the wound discharge, as well as a decrease in the severity of inflammation.

Keywords: bacteriophage; *Staphylococcus aureus*; infected skin wound; antimicrobial activity

For citation: Genatullina G.N. Study of the antimicrobial activity of staphylococcal bacteriophage on a model of an infected skin wound. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68 (9–10): 58–62. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-58-62>.

© Г. Н. Генатуллина, 2023

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

© G. N. Genatullina, 2023

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

Введение

В настоящее время остро стоит проблема антибиотикорезистентности, основными причинами возникновения которой являются нецелесообразное назначение антибиотиков медицинским персоналом и неконтролируемое их применение пациентами [1, 2]. В связи с чем разработка новых методов и средств лечения инфекционно-воспалительных заболеваний является актуальной задачей. На сегодняшний день применение бактериофагов в качестве альтернативы антибиотикам является одним из направлений по профилактике антибиотикорезистентности [3–5]. Сегодня существует достаточное количество работ, свидетельствующих о перспективности использования фаготерапии в лечении заболеваний органов мочевыделительной системы, установлена эффективность применения пиобактериофага у пациентов с инфекционной патологией хирургического профиля, синегнойного бактериофага в гнойной остеологии, комплексного бактериофага в лечении кишечной инфекции и т. д. [6, 7]. Одним из актуальных направлений является применение стафилококкового бактериофага с целью терапии инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами золотистого стафилококка [8].

Цель работы — изучение противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной кожной раны.

Материал и методы

Исследования проведены на нелинейных крысах-самцах (32 особи) массой 250–260 г. Все манипуляции с крысами осуществлялись согласно нормативным документам, регламентирующим правила содержания животных в лабораторных условиях (ГОСТ Р 50258-92, ГОСТ Р 51000.3-96 и 51000.4-96). Крысы получены из экспериментально-биологической клиники (виварий) Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России. Работа с животными одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России (протокол № 6 от 27.11.2018).

Рану наносили после сбривания шерсти путём рассечения кожи (2 см) скальпелем в межлопаточной области (все манипуляции проводили под эфирным наркозом), затем обрабатывали края раны суспензией *S.aureus* в дозе 10^4 микробных тел на крысу. Инфекционный агент выделен из мокроты пациентов, проходивших лечение в стационарных условиях ГБУЗ АО «ГКБ № 3 им. С. М. Кирова» (г. Астрахань).

Животные были разделены на 4 группы ($n=8$): «контроль» — интактные животные; «рана» — животные с инфицированной раной, не получавшие лечение; «рана+антисептик» — крысы, которые в качестве лечения получали

раствор хлоргексидина биглюконата 0,05% (Тульская фармацевтика, Россия) наружно 2 раза в день с 3-минутной экспозицией, начиная спустя 12 ч после нанесения раны, в течение 5 дней; «рана+бактериофаг» — крысы, получавшие в качестве лечения стафилококковый бактериофаг (раствор; Микроген НПО ФГУП, Россия) в том же режиме, как и хлоргексидина биглюконат.

Оценку противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной кожной раны проводили путём посева раневого отделяемого с подсчётом количества микробных тел *S.aureus* [9]. Подсчёт количества микробных тел проводили через 12 ч, на 3-и и 5-е сутки с помощью системы BioMic V3 для микробиологического анализа («Giles Scientific», США).

Степень воспаления оценивали по уровню С-реактивного белка (СРБ), общего количества лейкоцитов и лейкоцитарному индексу воспаления (ЛИИВ) [10]. Индекс рассчитывали по формуле: количество лейкоцитов $\times$ (палочкоядерные+юные+миелоциты) / (сегментоядерные + лимфоциты) (норма ЛИИВ 1,0–1,2). Состояние раны оценивали по динамике изменения размера гиперемии.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета Excel и программного обеспечения BIOSSTAT, с учётом критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми различия считали при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты оценки динамики развития гиперемии вокруг раны, инфицированной *S.aureus* показаны в табл. 1.

На 2-е сутки после инфицирования раны и нанесения терапевтического агента было отмечено нарастание воспалительного процесса во всех группах, при этом в группе нелеченых животных практически на 20%, в двух других — в среднем на 11% в сравнении с первым днем эксперимента. В группе «рана» со 2-х по 4-е сутки наблюдалось нарастание гиперемии, на 5-е сутки — снижение. В группе животных «рана+антисептик» с 3-х суток отмечалось уменьшение гиперемии на 25, 33 и 57% в сравнении с предыдущим днем; в группе «рана+бактериофаг» снижение размеров гиперемии на 27, 38 и 48%, соответственно.

На 3-и сутки было установлено, что размер гиперемии в группах «рана+антисептик» и «рана+бактериофаг» был меньше, чем в группе «рана» в среднем в 1,6 ($p < 0,05$) раза; на 4-е сутки — в 2,3 и 2,7 ($p < 0,01$) раза; на 5-е сутки — в 4,7 и 4,3 ($p < 0,01$) раза, соответственно.

На рис. 1 показаны изменения уровня СРБ на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Таблица 1. Динамика изменения гиперемии вокруг раны, инфицированной *S.aureus*
Table 1. Dynamics of changes in hyperemia around a wound infected with *S.aureus*

Экспериментальные группы	Радиус гиперемии, мм				
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	4-е сутки	5-е сутки
Рана	4,63 $\pm$ 0,52	5,35 $\pm$ 0,54	5,91 $\pm$ 0,43	6,00 $\pm$ 0,45	5,23 $\pm$ 0,57
Рана+антисептик	4,56 $\pm$ 0,61	5,12 $\pm$ 0,30	3,83 $\pm$ 0,28*	2,56 $\pm$ 0,19**	1,10 $\pm$ 0,07**
Рана+бактериофаг	4,61 $\pm$ 0,42	5,10 $\pm$ 0,41	3,74 $\pm$ 0,33*	2,33 $\pm$ 0,08**	1,21 $\pm$ 0,05**

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ по отношению к показателям группы «рана».

Note. * — $P < 0.05$; ** — $P < 0.01$ in relation to the indicators in the «wound» group.

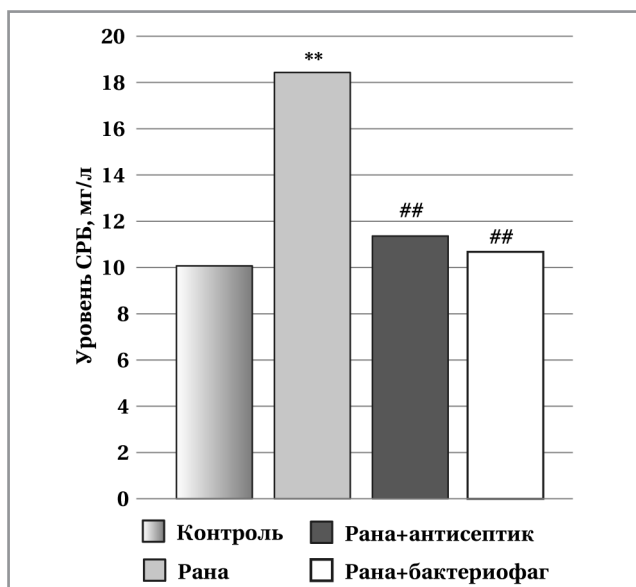


Рис. 1. Изменение уровня С-реактивного белка на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Примечание. * и # — $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «контроль» и «рана»; ** и ## — $p < 0,01$ по отношению к показателям группы «контроль» и «рана».

Fig. 1. Changes in C-reactive protein levels during treatment of an infected wound process with chlorhexidine bigluconate and staphylococcal bacteriophage.

Note. * and # — $P < 0.05$ in relation to the indicators in the «control» and «wound» groups; ** and ## — $P < 0.01$ in relation to the indicators in the «control» and «wound» groups.

Развитие инфекционного процесса в ране сопровождалось увеличением уровня СРБ в 1,8 ($p < 0,01$) раза по отношению к группе «контроль»; в условиях применения хлоргексидина биглюконата и стафилококкового бактериофага было отмечено снижение уровня данного показателя в среднем в 1,6 ($p < 0,01$) раза в сравнении с группой нелеченых животных.

На рис. 2 показаны изменения общего количества лейкоцитов на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Развитие раневой инфекции способствовало повышению общего количества лейкоцитов в сравнении с интактными животными в 2 раза ($p < 0,05$); на фоне проведенного лечения антисептиком и бактериофагом было отмечено снижение

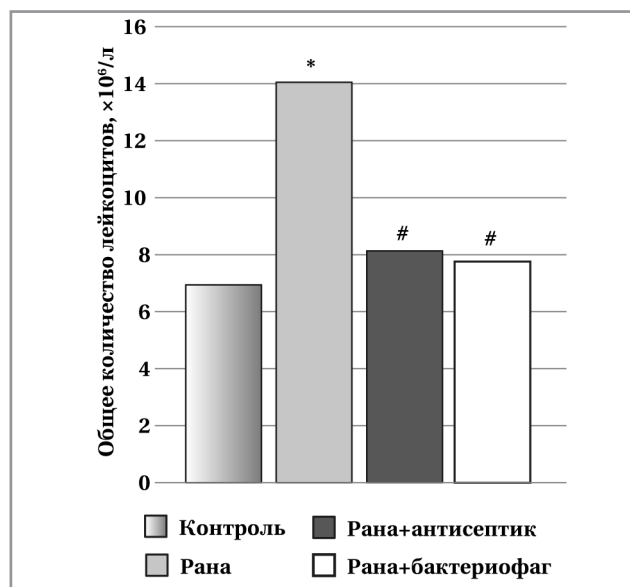


Рис. 2. Изменение уровня общего количества лейкоцитов на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Примечание. * и # — $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «контроль» и «рана».

Fig. 2. Changes in the level of total leukocyte count during treatment of an infected wound process with chlorhexidine bigluconate and staphylococcal bacteriophage.

Note. * and # — $P < 0.05$ in relation to the indicators in the «control» and «wound» groups.

данного показателя в среднем в 1,8 ($p < 0,05$) раза по отношению к группе «рана».

На рис. 3 показано изменение лейкоцитарного индекса воспаления на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Раневая инфекция привела к повышению лейкоцитарного индекса воспаления в 2,4 ($p < 0,01$) раза по отношению к интактным крысам; на фоне лечения хлоргексидином и бактериофагом отмечено снижение индекса практически в 2,2 раза ($p < 0,01$) в сравнении с группой нелеченых животных.

В табл. 2 представлены результаты микробиологического анализа раневого отделяемого в условиях лечения раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Развитие инфекционного процесса в ране сопровождалось нарастанием микробной массы че-

Таблица 2. Микробиологический анализ раневого отделяемого в условиях лечения раневого процесса
Table 2. Microbiological analysis of wound discharge during the treatment of wound process

Экспериментальные группы	Количество микробных тел <i>S.aureus</i> , тыс.		
	12 ч	3 сут	5 сут
Рана	12,88±1,20	14,56±1,29	6,75±0,74
Рана+антисептик	11,87±0,72	3,36±0,14**	0,22±0,01**
Рана+бактериофаг	11,47±0,94	1,99±0,10**	0,17±0,01**

Примечание. ** — $p < 0,01$ по отношению к показателям группы «рана».

Note. ** — $P < 0.01$ in relation to the indicators in the «wound» group.

рез 12 ч во всех экспериментальных группах. На 3-и сутки в группах животных, у которых в качестве лечения применяли хлоргексидин и бактериофаг отмечалось значительное снижение количества микробных тел *S.aureus* практически в 4,3 и 7 раз ($p<0,01$) в сравнении с нелеченной группой животных; на 5-е сутки количество колоний микроорганизмов также уменьшилось и по сравнению с группой «рана» практически в 31 и 39% ($p<0,01$) раз, соответственно.

Таким образом, принимая во внимание полученные результаты, можно сделать вывод о выраженной противомикробной активности стафилококкового бактериофага в условиях раневой инфекции при наружном его применении, что подтверждается снижением степени бактериальной обсеменённости отделяемого ран, а также уменьшении воспалительных явлений как на локальном уровне в виде снижения гиперемии, так и генерализованном в виде снижения уровня СРБ, общего количества лейкоцитов, а также уменьшения ЛИВ. Следует отметить, что противомикробный эффект сопоставим с наружным применением антисептического препарата — раствором хлоргексидина биглюконата 0,05%, однако при оценке микробной обсеменённости было установлено, что бактериофаг проявляет более выраженную антибактериальную активность, что вероятно связано с возможным развитием частичной перекрёстной резистентности за счёт активации эффлюксных насосов, что присуще внутрибольничным штаммам *S.aureus*, а также бактериостатического действия препарата, что характерно для концентрации раствора менее 0,05% [11–13].

Заключение

Таким образом, применение стафилококкового бактериофага на модели инфицированной *Staphylococcus aureus* кожной раны показало выраженную противомикробную активность, подтверждённую уменьшением количества колоний микроорганизма в отделяемом раны, а также снижением выраженности степени воспаления.

Литература/References

1. Намазова-Баранова Л. С., Баранов А. А. Антибиотикорезистентность в современном мире. Педиатрическая фармакология. 2017; 14 (5): 341–354. doi: <https://doi.org/10.15690/pf.v14i5.1782> [Namazova-Baranova L. S., Baranov A. A. Antibiotic resistance in modern world. Pediatr. tricheskaya Farmakologiya. 2017; 14 (5): 341–354. doi: <https://doi.org/10.15690/pf.v14i5.1782> (in Russian)]
2. Самотруева М. А., Цибизова А. А., Габитова Н. М., Озеров А. А., Тюренок И. Н. Противомикробная активность нового производного хинололина VMA-13-03. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2020; 83 (80): 24–28. doi: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2020-83-8-24-28>. [Samotrueva M. A., Tsiybizova A. A., Gabitova N. M., Ozerov A. A., Tyurenkov I. N. Antimicrobial activity of the new quinazoline derivative VMA-13-03. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2020; 83 (80): 24–28. doi: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2020-83-8-24-28> (in Russian)].

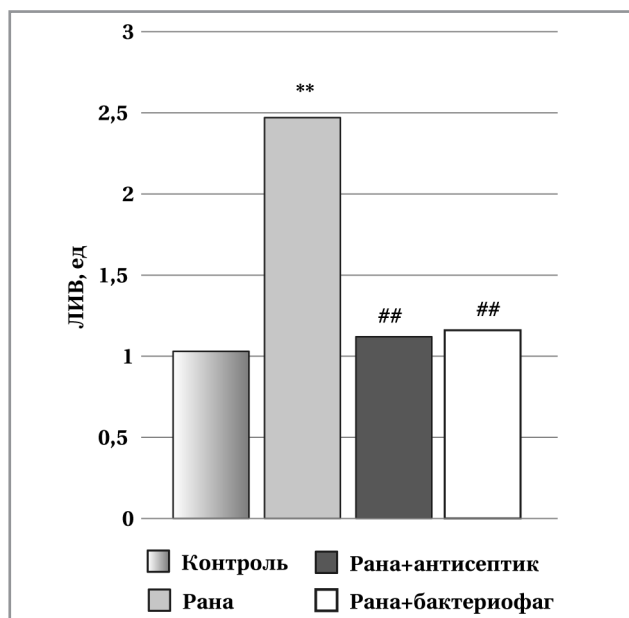


Рис. 3. Изменение уровня лейкоцитарного индекса воспаления на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Примечание. ** — $p<0,01$ по отношению к показателям группы «контроль»; # — $p<0,05$; ## — $p<0,01$ по отношению к показателям группы «рана».

Fig. 3. Changes in the level of leukocyte inflammation index during treatment of an infected wound process with chlorhexidine bigluconate and staphylococcal bacteriophage.

Note. ** — $P<0.01$ in relation to the indicators in the «control» group; # — $P<0.05$; ## — $P<0.01$ in relation to the indicators in the «wound» group.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации в части проведения НИР по теме «Разработка композиций для персонализированной антибактериальной терапии на основе вирулентных стафилококковых бактериофагов с контролируемой литической активностью».

3. Власов В. В., Тикунова Н. В., Морозова В. В. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине. Биохимия. 2020; 85 (11): 1587–1600. doi: <https://doi.org/10.31857/S0320972520110068> [Vlasov V.V., Tikunova N.V., Morozova V.V. Bacteriophages as therapeutic drugs: what hinders their use in medicine. Biohimiya. 2020; 85 (11): 1587–1600. doi: <https://doi.org/10.31857/S0320972520110068> (in Russian)].
4. Багаева В. В., Попова В. М., Пашкова Г. С., Исаджанян К. Е., Никитин В. В., Жиленков Е. Л. Изучение эффективности и безопасности применения антимикробных средств. Исследования и практика в медицине. 2015; 2 (3): 35–42. doi: <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2015-2-3-35-42> [Bagaeva V.V., Popova V.M., Pashkova G.S., Isadzhanyan K.E., Nikitin V.V., Zhilenkov E.L. The study of the efficacy and safety of antimicrobial agents. Issled. Prakt. Med. 2015; 2 (3): 35–42. doi: <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2015-2-3-35-42> (in Russian)].

5. Генатуллина Г. Н., Ясенявская А. Л., Цибизова А. А. Оценка литической активности бактериофага в отношении *Staphylococcus aureus*. Астраханский медицинский журнал. 2022; 17 (4): 78–84. doi <https://doi.org/10.48612/agmu/2022.17.4.78.84>. [Genatullina G. N., Yasyavskaya A. L., Tsibizova A. A. Assessment of the lytic activity of the bacteriophage against *Staphylococcus aureus*. Astrahanskij Medicinskij Zhurnal. 2022; 17 (4): 78–84. doi <https://doi.org/10.48612/agmu/2022.17.4.78.84> (in Russian)].
6. Асланов Б. И., Любимова А. В., Зуева Л. П. Бактериофаги как эффективные противоэпидемические средства для купирования вспышек внутрибольничных инфекций. Журнал инфектологии. 2019; 11 (1): 65–70. [Aslanov B. I., Lyubimova A. V., Zueva, L. P. Bacteriophages as effective anti-epidemic agents for stopping outbreaks of nosocomial infections. Journal of Infectology 2019; 11 (1): 65–70 (in Russian)].
7. Грудянов А. И., Фролова О. А., Исаджанян К. Е., Попова В. М. Изучение возможности совместного использования бактериофагов с антисептическими препаратами. Стоматология. 2016; 95 (6–2): 30. [Grudyanov A. I., Frolova O. A., Isadzhanian K. E., Popova V. M. Studying the possibility of combining bacteriophages with antiseptic drugs. Stomatologiya. 2016; 95 (6–2): 30 (in Russian)].
8. Воронкова О. С., Воробей Е. С., Рожнева И. Л., Шевченко Т. Н. Влияние стафилококкового бактериофага на процесс плёнообразования штаммов золотистого стафилококка. Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2019; 8 (1): 71–77. [Voronkova O. S., Vorobey E. S., Rozhneva I. L., Shevchenko T. N. The influence of staphylococcal bacteriophage on the process of film formation of *Staphylococcus aureus* strains. Laboratory Diagnostics. Vostochnaya Evropa. 2019; 8 (1): 71–77 (in Russian)].
9. Ярец Ю. И., Шевченко Н. И., Еремин В. Ф. Методология микробиологического посева раневого отделяемого в рамках современных представлений о диагностике инфекционного процесса. Лабораторная служба. 2021; 10 (3): 33–42. doi: <https://doi.org/10.17116/labs20211003133> [Yarets Yu. I., Shevchenko N. I., Eremine V. F. Methodology of microbiological culture of wound discharge within the framework of modern ideas about the diagnosis of an infectious process. Laboratornaya Sluzhba. 2021; 10 (3): 33–42. doi: <https://doi.org/10.17116/labs20211003133> (in Russian)].
10. Рыбдылов Д. Д., Хитричев В. Е. Применение лейкоцитарного индекса воспаления в гнойной хирургии. Вестник Бурятского государственного университета. 2011; 12: 62–64 [Rybdylov D. D., Khitrichev V. E. Application of the leukocyte inflammation index in purulent surgery. Vestnik Buryatskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 2011; 12: 62–64 (in Russian)].
11. Земляной А. Б., Афиногенова А. Г., Матвеев С. А. Применение антисептиков в лечении ран с высоким риском инфицирования. Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова, 2020; 15 (2): 129–137. doi: <https://doi.org/10.25881/BPNMSC.2020.61.32.023> [Zemlyanoy A. B., Afinogenova A. G., Matveev S. A. The use of antiseptics in the treatment of wounds with a high risk of infection. Vestnik Nacional'nogo Mediko-Hirurgicheskogo Centra im. N. I. Pirogova. 2020; 15 (2): 129–137. doi: <https://doi.org/10.25881/BPNMSC.2020.61.32.023> (in Russian)].
12. Costa S.S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. Open Microbiol J. 2013; 7: 59–71. doi: 10.2174/1874285801307010059.
13. Зухридинова А., Махкамова Д. Использование бактериофагов против золотистого стафилококка. Перспективы развития медицины. 2021; 1 (1): 630. [Zukhriddinova A., Makhkamova D. Use of bacteriophages against *Staphylococcus aureus*. Perspektivy Razvitiya Mediciny. 2021; 1 (1): 630. (in Russian)]

Информация об авторе

Генатуллина Гузель Наилевна — к. б. н., заместитель руководителя Научно-исследовательского центра; доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID: 0000-0001-5417-4477

About the authors

Guzel N. Genatullina — Ph. D. in Biology, Deputy 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: 0000-0001-5417-4477

Новые подходы к этиотропной терапии пациентов с ОРВИ препаратом риамилловир

К. В. ЖДАНОВ, О. В. МАЛЬЦЕВ, *К. В. КАСЬЯНЕНКО,
К. В. КОЗЛОВ, В. С. СУКАЧЕВ, Н. И. ЛЬВОВ, В. В. ШАРАБХАНОВ

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург, Россия

New Approaches to Etiotropic Therapy of ARVI Patients with Riamilovir

KONSTANTIN V. ZHDANOV, OLEG V. MALTSEV, *KRISTINA V. KASYANENKO,
KONSTANTIN V. KOZLOV, VITALII S. SUKACHEV, NIKOLAI I. LVOV,
VALERIAN V. SHARABHANOV

S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Цель. Провести исследование эффективности и безопасности препарата риамилловир у пациентов с диагнозом острая респираторная вирусная инфекция с использованием нескольких схем применения (дозирования) лекарственного средства. **Материал и методы.** Клиническую эффективность и безопасность препарата риамилловир оценивали на основании результатов исследования 150 пациентов в трёх сравниваемых группах, по 50 пациентов в каждой. Пациенты получали этиотропную противовирусную терапию риамилловиром по 1 капсуле (250 мг) 3 раза в сут на протяжении 5 дней в первой группе, во второй группе пациенты получали риамилловир в режиме «off label» по 1 капсуле (250 мг) 5 раз в сутки в течение 5 дней, третью группу составили 50 пациентов, получавших только патогенетическое лечение. **Результаты.** В результате проведённого исследования препарат риамилловир продемонстрировал высокий профиль безопасности независимо от режима дозирования, нежелательных явлений не зарегистрировано. Показано, что применение препарата риамилловир независимо от режима дозирования привело к статистически значимому сокращению сроков стационарного лечения. Следует отметить, что наименьшие сроки госпитализации отмечены у пациентов, получавших исследуемый препарат в повышенных суточных дозировках. Установлено, что применение риамилловира сокращало длительность и выраженность общепаразитарных проявлений заболевания, при этом полная элиминация возбудителей ОРВИ достигалась к 6-м суткам госпитализации, наименьшая общая длительность лихорадки и ряда синдромов поражения респираторного тракта зарегистрирована среди пациентов, получавших риамилловир в суточной дозе 1250 мг в течение 5 дней. **Заключение.** Этиотропный противовирусный препарат риамилловир показал клиническую эффективность при применении в обеих схемах лечения у пациентов с ОРВИ и хороший профиль безопасности.

Ключевые слова: острые респираторные вирусные инфекции; острые респираторные заболевания; риамилловир; нуклеозидные аналоги; грипп

Для цитирования: Жданов К. В., Мальцев О. В., Касьяненко К. В., Козлов К. В., Сукачев В. С., Львов Н. И., Шарабханов В. В. Новые подходы к этиотропной терапии пациентов с ОРВИ препаратом риамилловир. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68 (9–10): 63–71. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-63-71>.

Abstract

Aim. To study the efficacy and safety of Riamilovir in patients diagnosed with acute respiratory viral infection using several dosage regimens of the drug. **Material and Methods.** The clinical efficacy and safety of Riamilovir were evaluated based on the results of a study, that included 150 patients in three comparative groups, 50 patients each. The research groups received etiotropic antiviral therapy with 1 capsule (250 mg) of Riamilovir 3 times per day for 5 days in the first group; in the second group, patients received Riamilovir off-label — 1 capsule (250 mg) 5 times per day for 5 days; and the third group included 50 patients who received only pathogenetic treatment. **Results.** As a result of the study, Riamilovir demonstrated a high safety profile regardless of the dosage regimen; no adverse events were registered. It was shown that Riamilovir use, regardless of the dosage regimen, led to a statistically significant reduction in the duration of inpatient treatment. It should be noted that the shortest periods of hospitalization were observed in patients who received the studied drug at increased daily dosages. Riamilovir was found to reduce the duration and severity of general infectious signs of the disease, while complete elimination of ARVI pathogens occurred by the 6th day of hospitalization; the shortest total duration of fever and a number of respiratory tract syndromes was registered among patients receiving Riamilovir at a daily dose of 1250 mg for 5 days. **Conclusion.** The etiotropic antiviral drug Riamilovir has shown clinical efficacy when used in both treatment regimens in patients with acute respiratory viral infections, as well as a good safety profile.

Keywords: acute respiratory viral infections; acute respiratory infections; riamilovir; nucleoside analogues; influenza

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Академика Лебедева, д. 4/2, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: dr.snegur@gmail.com

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 4/2 Akademika Lebedeva st., S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. E-mail: dr.snegur@gmail.com

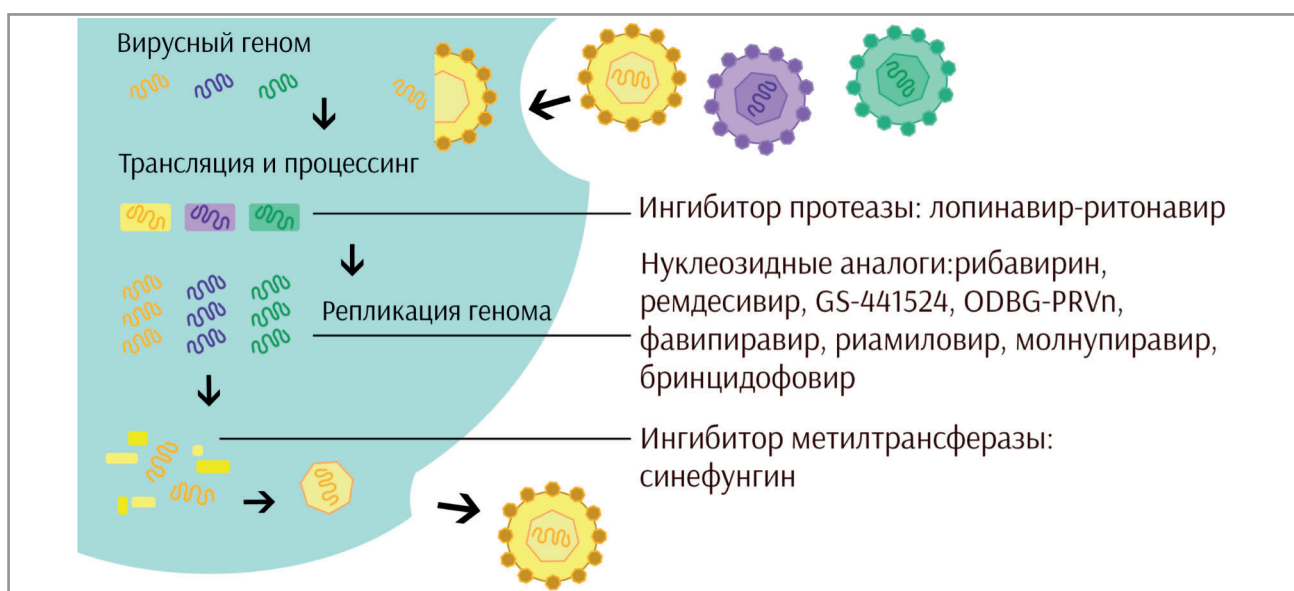
Введение

События последних лет ярко продемонстрировали масштаб угрозы распространения новых и вновь возникающих вирусных инфекций: преодоление межвидового барьера привело к появлению вспышек лихорадки Эбола, ближневосточного респираторного синдрома, глобальному распространению инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Кроме того, урбанизация, глобальное потепление, расширение географии и активности авиасообщений также оказывают существенное влияние на эпидемиологическую ситуацию, способствуя экспансии вирусных инфекций из эндемичных регионов. В частности, именно так началось активное распространение вируса лихорадки денге, которым, по оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2023 г., инфицированы более 350 млн человек в более чем 120 странах мира, и вируса лихорадки Зика, ставшего причиной крупнейшей вспышки инфекционной лихорадки на территории Южной и Центральной Америки, зарегистрированной в 2015 г.

Вирусные инфекции признаны одним из глобальных вызовов в сфере биологической безопасности, требующих поиска современных решений по удовлетворению сохраняющейся потребности в эффективных и безопасных противовирусных препаратах: при существующем многообразии вирусных угроз, одобренные фармацевтические лекарственные средства прямого противовирусного

действия доступны для лечения лишь 10 из указанных вирусных инфекций [1, 2].

Особое место среди них занимают фармакологические вещества, действующие на вирусные ферменты, в частности на протеазы и полимеразы вируса (рисунок). Препараты этой группы показывают высокую эффективность в отношении вирусов гепатита С, ВИЧ, а опыт активной фазы пандемии COVID-19 открыл перспективы использования ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы для терапии респираторных инфекций, которые продолжают занимать лидирующее место в общей структуре инфекционной патологии. Данная группа инфекций наносит значительный экономический ущерб государственному бюджету в связи с высокой частотой случаев нетрудоспособности среди населения [3, 4]. По оценкам экспертов, респираторные вирусные заболевания в периоды эпидемий затрагивают от 10 до 20% населения страны, ежегодно нанося экономический ущерб, превышающий 10 млрд руб. Анализируя основные препараты для лечения острых респираторных вирусных инфекций необходимо отметить ряд имеющихся недостатков: узкий спектр противовирусного действия, развитие резистентности, необходимость раннего начала применения препаратов (не позднее первых 2 сут заболевания), токсичность и развитие побочных эффектов, отсутствие более эффективных препаратов для лечения тяжёлых форм гриппозной инфекции и ограниченный выбор средств для



Представители препаратов прямого противовирусного действия и их мишени в цикле репродукции вируса.
Examples of direct antiviral drugs and their targets in the viral reproduction cycle.

лечения острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) негриппозной этиологии [5, 6].

Однако длительность и высокая стоимость синтеза принципиально новых лекарственных веществ, непредсказуемость возникновения новых вирусных эмерджентных инфекций, ограничивающая возможности разработки таргетной терапии, обуславливают приоритетность поиска «универсальных» противовирусных препаратов, обладающих широким спектром противовирусной активности [7]. В этом случае обоснованным является использование уже зарегистрированных препаратов по новым показаниям либо с изменённым режимом дозирования: указанные подходы целесообразно применять в периоды пиковых подъёмов заболеваемости гриппом и ОРВИ в целях максимального сокращения длительности заболевания и сроков пребывания в стационаре, при несвоевременном назначении лечения, а также у пациентов с тяжёлым течением болезни и/или отягощённым преморбидным фоном для предотвращения развития возможных осложнений. Преимущества «перепрофилирования» имеющихся лекарственных средств, наряду с оптимизацией схем назначения, были неоднократно и успешно продемонстрированы в период пандемии SARS-CoV-2 инфекции [8–11].

В соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации от 16 мая 2022 г. № 1180-р изменение режима дозирования лекарственных средств возможно на уровне локальных решений внутри медицинской организации [12]. В этой связи нами было проведено исследование, посвящённое оценке эффективности и безопасности препарата из группы ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы (нуклеозидного аналога) риамилвира у лиц с острыми респираторными вирусными инфекциями некоронавирусной (SARS-CoV-2) этиологии при различных режимах дозирования препарата. Выбор лекарственного препарата для исследования обоснован имеющимися данными о его высокой эффективности в терапии ОРВИ, подтверждёнными рядом крупных исследований и рекомендациями Минздрава России по лечению ОРВИ у взрослых [5, 13–15].

Материал и методы

В исследование были включены 150 мужчин и женщин в возрасте 18–27 лет, которые обратились за медицинской помощью с ОРВИ средней степени тяжести. Диагноз устанавливался на основании жалоб, анамнеза, данных объективного обследования пациента в соответствии с методическими рекомендациями по диагностике, лечению и профилактике острых респираторных заболеваний и гриппа в вооружённых силах Российской Федерации (М.: 2021). Длительность заболевания на момент включения в исследование не превышала 72 ч. При выявлении инфекции, вызванной SARS-CoV-2, при помощи молекулярно-генетического

тестирования на момент поступления и/или в течение периода наблюдения, участник исключался из исследования.

Перед включением в исследование участниками было подписано добровольное информированное согласие. Проведение исследования одобрено решением локального этического комитета от 20 сентября 2022 г., протокол № 268.

Пациенты были разделены на 3 группы. Рандомизация осуществлялась согласно таблицы случайных чисел, сгенерированных до начала исследования. Первую группу составили 50 пациентов, получавших, помимо стандартного патогенетического лечения, противовирусную терапию риамилвиrom в режиме 250 мг 3 раза в сутки на протяжении 5 дней, во вторую группу вошли 50 пациентов, получавших риамилвиrom в режиме «off label» 250 мг 5 раз в сутки в течение 5 дней в рамках предполагаемой научной гипотезы о наличии дозозависимого клинического эффекта [12]. Третья группа состояла из 50 пациентов, получавших только патогенетическое лечение.

В качестве параметров оценки эффективности сравниваемых схем лечения приняты следующие: продолжительность госпитализации и длительность основных клинических проявлений ОРВИ, а также выраженность синдрома общей инфекционной интоксикации по данным анамнеза и в динамике заболевания, извлечённым из медицинской документации. Субъективные и объективные проявления заболевания, проанализированные в исследовании, включали: лихорадку, кашель, синдром ринита, синдром фарингита, синдром трахеита. Выраженность синдрома общей инфекционной интоксикации (СОИИ) оценивалась по пятибалльной шкале, где 1 балл соответствовал незначительной выраженности синдрома, 5 баллов — ярко выраженному синдрому.

В рамках исследования проанализированы результаты лабораторных показателей, полученных от пациентов на момент поступления в стационар и при выписке. Рассматривались следующие лабораторные показатели: уровень эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, абсолютное содержание лимфоцитов, значение тромбоцитов, СОЭ, активность печёночных трансаминаз (аланинаминотрансфераза — АЛТ, аспартатаминотрансфераза — АСТ), уровень мочевины и креатинина крови. Дополнительно оценивали наличие генетического материала возбудителей ОРВИ в биоматериале, полученном при поступлении на стационарное лечение и на шестой день госпитализации. Кроме того, проведена оценка частоты возникновения осложнений заболевания в параллельных группах, исследуемых в течение наблюдаемого периода.

Безопасность применения препарата риамилвиrom оценивалась на основании частоты развития нежелательных явлений различной степени тяжести по данным субъективных жалоб в соответствии с текущей версией СТСАЕ (общей терминологии критериев нежелательных явлений), а также изменения уровня азотистых метаболитов и активности печёночных трансаминаз в крови, исследованных при поступлении пациентов на стационарное лечение и при выписке.

Все включённые в исследование пациенты находились на стационарном лечении в клинике инфекционных болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ в период с ноября 2022 г. по апрель 2023 г.

Средние выборочные значения количественных признаков сравниваемых показателей представлены в виде усечённого среднего (M), в таблицах — $M \pm SD$, где SD — стандартное отклонение. Значения возраста пациентов из исследуемых групп представлены в виде медианы (Me), 25% и 75% квартилей ($Q1$; $Q3$). Для статистической обработки полученных данных выбраны непараметрические методы статистического анализа. Для признаков, характеризующихся непрерывными случайными величинами, выбран U -критерий Манна–Уитни. Для категориальных признаков — точный тест Фишера. Уровнем статистической значимости выбран $p < 0,05$. Статистический анализ выполнен с использованием библиотеки SciPy пакета для научных исследований Anaconda языка Python.

Таблица 1. Распределение пациентов по возрасту и полу
Table 1. Distribution of patients by age and gender

Признак	Всего (<i>n</i> =150)	Группа			<i>p</i> ₁₋₂	<i>p</i> ₁₋₃	<i>p</i> ₂₋₃
		Риамилловир 5 р/сут (<i>n</i> =50) ₁	Риамилловир 3 р/сут (<i>n</i> =50) ₂	Без ПВТ (<i>n</i> =50) ₃			
Возраст, лет	22 [20; 25]	25 [22; 26]	25 [22; 26]	23 [19; 25]	0,489	0,001	0,005
Мужчины, <i>n</i>	139/150 (92,67%)	47/50 (94%)	46/50 (92%)	46/50 (92%)	1,0	1,0	1,0
Женщины, <i>n</i>	11/150 (7,33%)	3/50 (6%)	4/50 (8%)	4/50 (8%)	1,0	1,0	1,0

Примечание. Здесь и в табл. 2–7: ПВТ — противовирусная терапия.

Note. Here and in Table 2–7: ПВТ — antiviral therapy.

Таблица 2. Длительность госпитализации пациентов из сравниваемых групп
Table 2. Duration of hospitalization in patients from the compared groups

Признак	Всего (<i>n</i> =150)	Группа			<i>p</i> ₁₋₂	<i>p</i> ₁₋₃	<i>p</i> ₂₋₃
		Риамилловир 5 р/сут (<i>n</i> =50) ₁	Риамилловир 3 р/сут (<i>n</i> =50) ₂	Без ПВТ (<i>n</i> =50) ₃			
Койко-дней, дни (<i>M</i> ± <i>SD</i>)	9,14±3,31	6,86±1,28	7,95±2,56	9,46±3,83	0,048	<0,05	0,046

Таблица 3. Длительность и выраженность общинфекционных проявлений у пациентов из сравниваемых групп
Table 3. Duration and severity of general infectious manifestations in patients from the compared groups

Признак	Группа			<i>p</i> ₁₋₂	<i>p</i> ₁₋₃	<i>p</i> ₂₋₃
	Риамилловир 5 р/сут (<i>n</i> =50) ₁	Риамилловир 3 р/сут (<i>n</i> =50) ₂	Без ПВТ (<i>n</i> =50) ₃			
Длительность СОИИ, сут	3,6±2,2	4,17±2,64	5,44±3,4	0,231	0,0007	0,0035
Выраженность СОИИ, баллы	2,04±1,08	2,12±1,02	3,06±1,11	0,596	<0,05	<0,05
Общая длительность лихорадки, сут	2,08±1,23	2,78±1,64	3,88±2,52	0,017	<0,05	0,013
Длительность фебрильной лихорадки, сут	1,17±0,38	1,42±0,94	2,30±1,85	0,389	0,0009	0,015

Результаты исследования

Распределение пациентов по полу и возрасту представлено в табл. 1.

Мужчины составили 92,67% исследуемой популяции. Пациенты из группы, не получавшей противовирусную терапию, были моложе пациентов, получавших риамилловир ($p<0,05$).

Средняя длительность госпитализации пациентов, включённых в исследование, составила 9,14±3,31 дней. Сравнение длительности госпитализации пациентов из сравниваемых групп представлено в табл. 2.

Данные табл. 2 показывают, что срок госпитализации пациентов, принимавших противовирусную терапию препаратом риамилловир, был статистически значимо ниже, чем у пациентов, не получавших этиотропное лечение ($p<0,05$), при этом наименьшая длительность стационарного лечения отмечена у пациентов, получавших риамилловир в режиме 5 раз в сут в течение 5 дней ($p<0,05$).

В табл. 3 приведены результаты сравнения длительности и выраженности общинфекцион-

ных проявлений у пациентов из рассматриваемых групп.

Длительность и выраженность СОИИ у пациентов независимо от режима дозирования исследованного препарата на протяжении всего периода госпитализации были статистически значимо ниже, чем у пациентов из группы, где противовирусная терапия не назначалась ($p<0,05$).

Общая длительность лихорадки статистически значимо отличалась между всеми сравниваемыми группами пациентов: наименьшая длительность зарегистрирована среди лиц, получавших риамилловир в режиме 1250 мг в сутки в течение 5 дней ($p<0,05$). Длительность фебрильной лихорадки была статистически значимо меньше в группах пациентов, получавших противовирусную терапию независимо от суточной дозировки ($p<0,05$).

В табл. 4 представлены результаты оценки длительности синдромов поражения респираторного тракта у пациентов из исследуемых групп.

Как видно из табл. 4, различий в длительности кашля, трахеита у пациентов из сравниваемых групп зарегистрировано не было ($p>0,05$).

Таблица 4. Длительность основных синдромов поражения респираторного тракта у пациентов из сравниваемых групп**Table 4. Duration of the main syndromes of respiratory tract infections in patients from the compared groups**

Признак	Группа			P_{1-2}	P_{1-3}	P_{2-3}
	Риамиловир 5 р/сут ($n=50$) ₁	Риамиловир 3 р/сут ($n=50$) ₂	Без ПВТ ($n=50$) ₃			
Кашель, сут	3,14±1,76	3,33±1,90	3,51±2,06	0,763	0,571	0,718
Ринит, сут	3,07±1,62	4,11±1,57	4,26±2,34	0,003	0,011	0,968
Фарингит, сут	3,45±1,72	4,17±1,77	4,44±2,31	0,029	0,024	0,761
Трахеит, сут	2,71±0,88	2,20±0,4	2,83±1,67	0,22	1,0	0,847

Таблица 5. Частота развития поражения придаточных пазух носа у пациентов из сравниваемых групп**Table 5. Frequency of lesion development in the paranasal sinuses in patients from the compared groups**

Признак	Всего ($n=150$)	Группа			P_{1-2}	P_{1-3}	P_{2-3}
		Риамиловир 5 р/сут ($n=50$) ₁	Риамиловир 3 р/сут ($n=50$) ₂	Без ПВТ ($n=50$) ₃			
Катаральный синусит, n	11/150 (7,33%)	3/50 (6,0%)	3/50 (6,0%)	5/50 (10,0%)	1,0	0,574	0,719
Гнойный синусит, n	4/150 (2,67%)	0/50 (0,0%)	1/50 (2,0%)	3/50 (6,0%)	1,0	0,242	0,617
Всего, n	15/150 (10%)	3/50 (6,0%)	4/50 (8,0%)	8/50 (16,0%)	1,0	0,199	0,356

Длительность объективных и субъективных признаков фарингита, ринита была статистически значимо меньше у пациентов из группы получавших риамиловир в режиме 1250 мг в сутки по сравнению с пациентами, принимавшими стандартную дозировку препарата и не принимавшими этиотропное лечение ($p<0,05$).

За период проведения исследования у части пациентов из рассматриваемых групп отмечали развитие осложнений со стороны придаточных пазух носа в виде острого синусита. При анализе частоты выявления указанного осложнения, получены следующие данные (табл. 5).

Острый катаральный синусит выявлен у 7,33% пациентов, гнойный синусит развивался лишь у 2,67% пациентов. Статистически значимых различий в частоте выявления указанных состояний у пациентов из сравниваемых групп не отмечено ($p>0,05$). При этом, анализ числа острых гнойных синуситов в сравниваемых группах показал, что они не регистрировались в группе пациентов, получавших риамиловир в суточной дозировке 1250 мг. В то же время необходимо отметить, что за период проведения исследования других осложнений ОРВИ в виде пневмоний, миокардитов и т. д. ни в одной из сравниваемых групп зарегистрировано не было.

Оценка лабораторной картины заболевания у пациентов из сравниваемых групп представлена в табл. 6.

Статистически значимых различий при сравнении указанных показателей при поступлении и при выписке получено не было ($p>0,05$).

На всём протяжении исследования пациенты не отмечали нежелательных явлений, которые

могли быть связаны с приёмом исследуемого препарата.

Результаты, полученные при оценке частоты элиминации возбудителей ОРВИ в 1-е и 6-е сутки госпитализации на фоне различных схем лечения, представлены в табл. 7.

При лабораторном исследовании 150 первичных проб, содержащих носоглоточные смывы методом ПЦР, у 33,33% пациентов были идентифицированы возбудители ОРВИ, при исследовании мазков, взятых на 6-е сутки госпитализации, возбудители выявлены у 12,67% пациентов. Наиболее часто обнаруживались РНК риновируса (7,33% случаев) и РНК вируса гриппа А (4,66% случаев). Обращает на себя внимание 100% элиминация возбудителей ОРВИ в группе пациентов, получавших риамиловир в режиме 5 раз в сутки в течение 5 дней. В группе лиц, получавших риамиловир в стандартной дозировке, обнаружение вируса в повторных мазках наблюдалось в 2% случаев, а именно только у 1 пациента из 50. В группе пациентов, не получавших противовирусную терапию, отсутствие элиминации возбудителей ОРВИ к 6 суткам стационарного лечения наблюдалась в 36% случаев. Это существенно превышало частоту выявления возбудителей при контрольном исследовании материала из носоглотки в группах пациентов, получивших противовирусную терапию риамиловиром ($p<0,05$).

Обсуждение

Результаты нашего исследования подчеркнули очевидную перспективность использования нуклеозидных аналогов в терапии ОРВИ у взрос-

Таблица 6. Оценка связи лабораторной картины ОРВИ с различными схемами лечения
Table 6. Assessment of the relationship between the laboratory signs of ARVI and various treatment regimens

Период	Параметр	Группа			Референсные значения
		Риамиловир 5 р/сут (n=50)	Риамиловир 3 р/сут (n=50)	Без ПВТ (n=50)	
Поступление	Эритроциты, $10^{12}/л$	4,81±0,43	4,85±0,33	4,97±0,33	3,9–5,0
Выписка		4,86±0,43	4,83±0,49	5,06±0,33	
	<i>p</i>	0,761	0,569	0,642	
Поступление	Гемоглобин, г/л	143,23±10,33	143,85±10,61	146,74±10,38	120,0–150,0
Выписка		143,67±11,13	144,42±15,83	155,68±8,13	
	<i>p</i>	0,286	0,893	0,234	
Поступление	Лейкоциты, $10^9/л$	6,57±2,78	6,25±2,37	6,56±1,81	4,0–9,0
Выписка		5,41±1,22	6,09±2,16	6,64±2,0	
	<i>p</i>	0,659	0,761	0,149	
Поступление	Лимфоциты, $10^9/л$	1,47±0,64	1,53±0,57	1,62±0,55	1,2–3,0
Выписка		1,62±0,69	1,64±0,61	1,84±0,86	
	<i>p</i>	0,378	0,652	0,778	
Поступление	Тромбоциты, $10^9/л$	226,7±50,26	212,09±54,49	215,51±55,15	150,0–400,0
Выписка		231,23±39,42	249,03±81,59	221,42±62,25	
	<i>p</i>	0,594	0,698	0,674	
Поступление	СОЭ, мм/ч	14,11±14,02	15,23±11,87	8,95±6,14	0,0–15,0
Выписка		15,23±7,31	13,43±8,4	14,23±10,5	
	<i>p</i>	0,689	0,787	0,543	
Поступление	АЛТ, Ед/л	15,83±6,85	16,3±4,49	16,03±7,01	0,0–42
Выписка		23,65±6,91	23,47±5,87	23,14±4,21	
	<i>p</i>	0,139	0,149	0,387	
Поступление	АСТ, Ед/л	22,46±6,62	23,44±9,93	20,22±5,99	0,0–40
Выписка		29,8±7,27	27,62±6,39	26,86±7,52	
	<i>p</i>	0,106	0,298	0,795	
Поступление	Креатинин, мкмоль/л	0,63±0,31	0,66±0,35	0,58±0,31	0,2–1,2
Выписка		0,86±0,14	0,93±0,19	0,86±0,21	
	<i>p</i>	0,657	0,278	0,159	
Поступление	Мочевина, ммоль/л	3,59±0,9	3,88±0,98	3,74±1,25	2,6–7,3
Выписка		3,77±0,68	3,95±0,71	3,78±0,6	
	<i>p</i>	0,287	0,542	0,487	

лых. Риамиловир в обеих схемах дозирования показал высокую эффективность, хорошую переносимость и профиль безопасности. При этом наиболее значимые клинические эффекты наблюдались при использовании повышенных дозировок противовирусного препарата.

Заболевания, вызванные вирусами гриппа А и В, метапневмовирусом человека, респираторно-синцитиальным вирусом, ежегодно входят в число ведущих причин летальных исходов, в особенности среди лиц с повышенным риском (дети, лица пожилого возраста, лица из организованных коллективов) [16–20]. Одними из ключевых факторов развития осложнённого течения указанных заболеваний признаны неполная и/или несвоевременная противовирусная терапия, которая в комбинации с недостаточным системным иммунным ответом в связи с коротким инкубационным периодом, высокой контагиозностью возбудителей и вовлечением в патофизиологический каскад слизистых оболочек, индуцирует более длительную персистенцию вирусов в восприимчивых тканях. Парадоксальную пролонгацию репликации вируса в ответ на неадекватную противовирусную терапию связывают с замедлением темпа

проникновения и последующей репликации возбудителя в «частично защищённой» («partially protected») клетке, что указывает на важность подбора оптимальных режимов дозирования, основываясь на особенностях фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов [21–25]. Эти данные согласуются с полученными в ходе нашего исследования результатами: максимальное сокращение длительности заболевания и 100% элиминация вирусных патогенов различной этиологии к 6-м суткам стационарного лечения были достигнуты у пациентов, получавших риамиловир в режиме 1250 мг в сутки в течение 5 дней. Полученный результат исследования имеет первоочередное значение в отношении изучения вариантов применения противовирусных лекарственных препаратов с целью достижения максимальной клинической эффективности, уменьшения частоты развития осложнений и эпидемиологической опасности пациентов.

К значимым результатам проведённого исследования мы также относим отсутствие лабораторных признаков гепато- и/или нефротоксичности при применении препарата риамиловир как в стандартных, так и в повышенных режимах дози-

Таблица 7. Частота выявления возбудителей ОРВИ в сравниваемых группах

Table 7. Frequency of detection of ARVI pathogens in the compared groups

Возбудитель	Всего (n=150)		Риамиловир 5 р/сутки (n=50)		Риамиловир 3 р/сутки (n=50)		Без ПВТ (n=50)	
	1-е сут	6-е сут	1-е сут	6-е сут	1-е сут	6-е сут	1-е сут	6-е сут
РНК Iу — Influenza virus A (вирус гриппа А)	7/150	3/150	3/50	0/50	1/50	0/50	3/50	3/50
РНК Iу — Influenza virus A/H1N1pdm2009 (вирус «свиной»)	6/150	3/150	2/50	0/50	1/50	0/50	3/50	3/50
РНК Iу — Influenza virus B (вирус гриппа В)	5/150	2/150	2/50	0/50	—	—	3/50	2/50
РНК hRSv — Respiratory Syncytial virus (респираторно- синцитиальный вирус человека)	3/150	0/150	3/50	0/50	—	—	—	—
РНК hMPv — Metapneumovirus (метапневмовирус человека)	6/150	2/150	3/50	0/50	—	—	3/50	2/50
РНК hCv — Coronavirus (коронавирус человека)								
HKU-1, OC 43	6/150	2/150	2/50	0/50	3/50	1/50	1/50	1/50
РНК hRv — Rhinovirus (риновирус человека)	11/150	5/150	3/50	0/50	3/50	0/50	5/50	5/50
ДНК hAdv — Adenovirus B, C, E (Аденовирус человека групп В, С и Е)	3/150	1/150	—	—	2/50	0/50	1/50	1/50
ДНК hBv — Bocavirus (бокавирус человека)	1/150	0/150	1/50	0/50	—	—	—	—
РНК hPiv — Parainfluenza virus (вирус парагриппа человека 1, 2, 3 и 4 типов)	2/150	1/150	—	—	1/50	0/50	1/50	1/50
Всего	50/150 (33,33%)	19/150 (12,67%)	19/50 (38,0%)	0/50 (0,0%)	11/50 (22,0%)	1/50 (2,0%)	20/50 (40,0%)	18/50* (36,0%)

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении частоты выявления возбудителей на 6-е сутки госпитализации в группе пациентов без ПВТ по сравнению с группами пациентов, получавших риамиловир.

Note: * — $P < 0.05$, when comparing the detection rate of pathogens on the 6th day of hospitalization in the group of patients without AVT compared with the groups of patients receiving riamilovir.

ровки. По доступным данным поиск терапевтического окна противовирусных препаратов широкого спектра действия представляет сложность ввиду прямого и/или опосредованного действия на ферментные структуры клеток организма-хозяина, а также отсутствия окончательного представления о механизмах действия ряда противовирусных соединений и особенностях их распределения в конкретных тканях. Более того, противовирусная активность, полученная при использовании препаратов с широким спектром действия на культивированных клетках, может нивелироваться при применении на животных моделях: так, дизатиниб (ингибитор Src и c-Abl киназ) продемонстрировал широкий спектр противовирусной активности на культурах клеток, однако его использование на лабораторных животных приводило к развитию иммуносупрессии [26, 27]; введение бринцидофовира пациентам, инфицированным вирусом оспы обезьян, осложнялось выраженной гепатотоксичностью [28]; лечение фавипиравиром и молнупиравиром требует осторожности в связи с тератогенностью [29, 30]. Отсутствие лабораторных признаков токсич-

ности при использовании риамиловира мы связываем с его высокой селективностью как лекарственного средства.

При этом очевидна необходимость проведения дополнительных исследований эффективности применения нуклеозидных аналогов для терапии ОРВИ в контингентах пожилых и коморбидных лиц, а также целесообразно рассмотрение применения новых процедур и методов оценки противовирусной активности исследуемого препарата, в том числе с использованием биологически релевантных моделей для расширения знаний о фармакологических свойствах и принципах распределения препарата в тканях.

Таким образом, противовирусный препарат риамиловир показал высокую клиническую эффективность при применении в обеих схемах лечения у пациентов с гриппом и ОРВИ и хороший профиль безопасности. Кроме того, применение риамиловира в режиме дозирования препарата 1250 мг в сутки у госпитализированных пациентов приводило не только к более выраженным клиническим эффектам (меньшая частота развития осложнений, меньшая длитель-

ность основных проявлений заболевания), но и к полной элиминации возбудителей ОРВИ в исследуемой группе к 6-му дню госпитализации.

Литература/References

1. Dengue and severe dengue. World Health Organization. Ссылка активна на 11.08.2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
2. Guo Z., Jing W., Liu J., Liu M. The global trends and regional differences in incidence of Zika virus infection and implications for Zika virus infection prevention. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022; 21; 16 (10): e0010812. doi: 10.1371/journal.pntd.0010812.
3. Холиков И.В. Теоретико-правовая характеристика современных глобальных вызовов и угроз в сфере здравоохранения. Актуальные проблемы государства и права. 2022; 6 (4): 547–555. doi: <https://doi.org/10.20310/2587-9340-2022-6-4-547-555>. [Kholikov I.V. Teoretiko-pravovaya kharakteristika sovremennykh global'nykh vyzovov i ugroz v sfere zdra-vookhraneniya [Theoretical and legal characteristics of modern global challenges and threats in the field of healthcare]. *Aktual'nye Problemy Gosudarstva i Prava* = Current Issues of the State and Law. 2022; 6 (4): 547–555. doi: <https://doi.org/10.20310/2587-9340-2022-6-4-547-555> (in Russian)]
4. Есипов А.В., Алехнович А.В. Военная безопасность государства в условиях эпидемий: история и современность. Военная мысль. 2022; 1: 65–77. [Yesipov A.V., Alekhnovich A.V. The Military Security of the State during Epidemics: History and Modernity. *Military Thought*. 2022; 1: 65–77. (in Russian)]
5. Сабитов А.У., Ковтун О.П., Бацкалевич Н.А., Мальцев О.В., Жданов К.В., Эсауленко Е.В., Тихонова Е.П., Калинина Ю.С., Сорокин П.В., Чепур С.В., Степанов А.В. Метаанализ рандомизированных контролируемых клинических исследований эффективности препарата Риамиловир в этиотропной терапии острой респираторной вирусной инфекции. Антибиотики и химиотер. 2021; 66 (5–6): 48–57. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-5-6-48-57>. [Sabitov A.U., Kovtun O.P., Batskalevich N.A., Maltsev O.V., Zhdanov K.V., Esaulenko E.V., Tikhonova E.P., Kalinina Yu.S., Sorokin P.V., Chepur S.V., Stepanov A.V. Meta-analysis of randomized controlled clinical trials of Riamilovir efficacy in the etiotropic therapy of acute respiratory viral infection. *Antibiotiki i Khimioter* = Antibiotics and Chemotherapy. 2021; 66 (5–6): 48–57. (in Russian)]
6. Лазарева Н.Б., Журавлева М.В., Пантелева Л.Р. ОРВИ: рациональная фармакотерапия с позиции клинической фармакологии. Медицинский совет. 2016; 4: 68–73. doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701x-2016-4-68-73>. [Lazareva N.B., Zhuravleva M.V., Panteleeva L.R. ARVI: rational pharmacotherapy from the standpoint of clinical pharmacology. *Meditinskiy Sovet*. 2016; 4: 68–73. doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701x-2016-4-68-73>. (in Russian)]
7. Bekerman E., Einvav S. Infectious disease. Combating emerging viral threats. *Science*. 2015; 348 (6232): 282–283. 2015; 348 (6232): 282–283. doi: 10.1126/science.aaa3778.
8. Szemiel A.M., Merits A., Orton R.J., MacLean O.A., Pinto R.M., Wickenhagen A., Lieber G., Turnbull M.L., Wang S., Furnon W., Suarez N.M., Mair D., da Silva Filipe A., Willett B.J., Wilson S.J., Patel A.H., Thomson E.C., Palmarini M., Kohl A., Stewart M.E. In vitro selection of Remdesivir resistance suggests evolutionary predictability of SARS-CoV-2. *PLoS Pathog*. 2021; 17 (9): e1009929. doi: 10.1371/journal.ppat.1009929.
9. Мальцев О.В., Касьяненко К.В., Козлов К.В., Жданов К.В., Лапиков И.И. Перспективы использования нуклеозидного аналога риамиловира в лечении пациентов с инфекцией, вызванной SARS-CoV-2. Терапевтический архив. 2022; 94 (10): 1171–1176. doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2022.10.201920>. [Maltsev O.V., Kasyanenko K.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Lapikov I.I. Prospects of using the nucleoside analogue riamilovir in patients with SARS-CoV-2 infection. *Terapevticheskiy Arkhiv* (Ter. Arkh.). 2022; 94 (10): 1171–1176. doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2022.10.201920>. (in Russian)]
10. Warren T.K., Jordan R., Lo M.K., Ray A.S., Mackman R.L., Soloveva V., Siegel D., Perron M., Bannister R., Hui H.C., Larson N., Strickley R., Wells J., Stuthman K.S., Van Tongeren S.A., Garza N.L., Donnelly G., Shurtleff A.C., Retterer C.J., Gharraibeh D., Zamani R., Kenny T., Eaton B.P., Grimes E., Welch L.S., Gomba L., Wilhelmsen C.L., Nichols D.K., Nuss J.E., Nagle E.R., Kugelman J.R., Palacios G., Doerffler E., Neville S., Carra E., Clarke M.O., Zhang L., Lew W., Ross B., Wang Q., Chun K., Wolfe L., Babusis D., Park Y., Stray K.M., Trancheva I., Feng J.Y., Barauskas O., Xu Y., Wong P., Braun M.R., Flint M., McMullan L.K., Chen S.S., Fearn R., Swaminathan S., Mayers D.L., Spiropoulou C.E., Lee W.A., Nichol S.T., Cihlar T., Bavari S. Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature*. 2016; 531 (7594): 381–385. doi: 10.1038/nature17180.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

11. Willyard C. How antiviral pill molnupiravir shot ahead in the COVID drug hunt. *Nature*. 2021. doi: 10.1038/d41586-021-02783-1. Online ahead of print.
12. Распоряжение Правительства РФ от 16 мая 2022 г. N 1180-р О перечне заболеваний или состояний (групп заболеваний или состояний), при которых допускается применение лекарственного препарата в соответствии с показателями (характеристиками) лекарственного препарата, не указанными в инструкции по его применению. Ссылка активна на 01.08.2023. <https://base.garant.ru/404700683/#friends>. [Rasporyazhenie Pravitel'stva RF ot 16 maya 2022 g. N 1180-r O perechne za-bolevaniy ili sostoyaniy (grupp zabolevaniy ili sostoyaniy), pri kotorykh dopuskaetsya primeneniye lekarstvennogo preparata v sootvetstviy s pokazatelyami (kharakteristikami) lekarstvennogo preparata, ne ukazannymi v instruktsii po ego primeneniyu. Ssylka aktivna na 01.08.2023. <https://base.garant.ru/404700683/#friends>. (in Russian)]
13. Лioзнов Д.А., Токин И.И., Зубкова Т.Г., Сорокин П.В. Практика применения отечественного противовирусного препарата в этиотропной терапии острой респираторной вирусной инфекции. Терапевтический архив. 2020; 12: 59–63. doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.12.200427>. [Lioznov D.A., Tokin I.I., Zubkova T.G., Sorokin P.V. The practice of using a domestic antiviral drug in the etiotropic therapy of acute respiratory viral infection. *Therapeutic Archive*. 2020; 92 (12): 160–164. doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.12.200427>. (in Russian)]
14. Токин И.И., Зубкова Т.Г., Дроздова Ю.В., Лioзнов Д.А. Опыт этиотропной терапии ОРВИ отечественным противовирусным препаратом. Инфекционные болезни. 2019; 17 (4): 13–17. doi: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-4-13-17>. [Tokin I.I., Zubkova T.G., Drozdova Yu.V., Lioznov D.A. Experience of etiotropic therapy of acute respiratory viral infection with domestic antiviral drug. *Infekc. Bolezni* (Infectious diseases). 2019; 17 (4): 13–17. doi: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-4-13-17>. (in Russian)]
15. Федеральные клинические рекомендации Минздрава РФ по лечению ОРВИ у взрослых, 2021 г. ID 724, одобрены Научно-практическим Советом Минздрава РФ. Ссылка активна на 01.08.2023. https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/724_1. [Federal'nye klinicheskie rekomendatsii Minzdrava RF po lecheniyu ORVI u vzroslykh, 2021 g. ID 724, odobreny Nauchno-prakticheskim Sovetom Minzdrava RF. Ssylka aktivna na 01.08.2023. https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/724_1. (in Russian)]
16. Watson A., Wilkinson T.M.A. Respiratory viral infections in the elderly. *Ther Adv Respir Dis*. 2021; 15: 1753466621995050. doi: 10.1177/1753466621995050.
17. Li Y., Wang X., Blau D.M., Caballero M.T., Feikin D.R., Gill C.J., Madhi S.A., Omer S.B., Simões E.A.F., Campbell H., Pariente A.B., Bardach D., Bassat Q., Casalegno J.S., Chakhunashvili G., Crawford N., Danilenko D., Do L.A.H., Echavarria M., Gentile A., Gordon A., Heikkinen T., Huang Q.S., Jullien S., Krishnan A., Lopez E.L., Markić J., Mira-Iglesias A., Moore H.C., Moyes J., Mwananyanda L., Nokes D.J., Noorden E., Obodai E., Palani N., Romero C., Salimi V., Satav A., Seo E., Shchomak Z., Singleton R., Stolyarov K., Stoszek S.K., von Gottberg A., Wurzel D., Yoshida L.M., Yung C.F., Zar H.J., *Respiratory Virus Global Epidemiology Network*; Nair H.; RESCEU investigators. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022; 399 (10340): 2047–2064. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00478-0.
18. Zimmerman R.K., Balasubramani G.K., D'Agostino H.E.A., Clarke L., Yassin M., Middleton D.B., Silveira F.P., Wheeler N.D., Landis J., Peterson A., Suyama J., Weissman A., Nowalk M.P. Population-based hospitalization burden estimates for respiratory viruses, 2015–2019. *Influenza Other Respir Viruses*. 2022; 16 (6): 1133–1140. doi: 10.1111/irv.13040.
19. Юхно М.В., Колесников С.В., Горностаева Ж.А., Сидорчук С.Н. Организация стационарной помощи в период эпидемии гриппа и ОРВИ сезона 2016 года в Великом Новгороде. Журнал инфектологии. 2016; 8 (4): 79–87. doi: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2016-8-4-79-87>. [Yuhno M.V., Kolesnikov S.V., Gornostaeva J.A., Sidorchuk S.N. The organization of hospital care during the epidemic of influenza and SARS for the 2016 season in Veliky Novgorod. *Journal Infectology*. 2016; 8 (4): 79–87. doi: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2016-8-4-79-87>. (in Russian)]
20. Артебякин С.В., Кузин А.А., Пищугин Д.Ю., Кучеров А.С., Вольников И.О. Этиологическая структура респираторных вирусных инфекций в организованном воинском коллективе Центрального военного округа в периоды эпидемических сезонов 2016–2020 гг. Известия

- Российской военно-медицинской академии. 2020; 39 (4): 45–48. [Artebyakin S.V., Kuzin A.A., Pishchugin D.Y., Kucherov A.S., Volynkov I.O. Etiological structure of respiratory viral infections in the organized military collective of the central military district during the epidemic seasons 2016–2020. *Izvestiya Rossijskoj Voenno-medicinskoj akademii*. 2020; 39 (4): 45–48. (in Russian)]
21. Arfijanto M.V., Asmarawati T.P., Bramantono B., Rusli M., Rachman B.E., Mahdi B.A., Nasronudin N., Hadi U. Duration of SARS-CoV-2 RNA shedding is significantly influenced by disease severity, bilateral pulmonary infiltrates, antibiotic treatment, and diabetic status: consideration for isolation period. *Pathophysiology*. 2023; 30 (2): 186–198. doi: 10.3390/pathophysiology30020016.
 22. Kim K.S., Iwanami S., Oda T., Fujita Y., Kuba K., Miyazaki T., Ejima K., Iwami S. Incomplete antiviral treatment may induce longer durations of viral shedding during SARS-CoV-2 infection. *Life Sci Alliance*. 2021; 4 (10): e202101049. doi: 10.26508/lsa.202101049.
 23. Nowak M., May R.M. *Virus Dynamics: Mathematical Principles of Immunology and Virology: Mathematical Principles of Immunology and Virology*. UK: Oxford University Press. 2000.
 24. Perelson A.S. Modelling viral and immune system dynamics. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2 (1): 28–36. doi: 10.1038/nri700.
 25. Williamson B.N., Feldmann F., Schwarz B., Meade-White K., Porter D.P., Schulz J., van Doremalen N., Leighton I., Yinda C.K., Pérez-Pérez L., Okumura A., Lovaglio J., Hanley P.W., Saturday G., Bosio C.M., Anzick S., Barbican K., Cihlar T., Martens C., Scott D.P., Munster V.J., de Wit E. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *Nature*. 2020; 585 (7824): 273–276. doi: 10.1038/s41586-020-2423-5.
 26. Reeves P.M., Smith S.K., Olson V.A., Thorne S.H., Bornmann W., Damon I.K., Kalman D. Variola and monkeypox viruses utilize conserved mechanisms of virion motility and release that depend on abl and SRC family tyrosine kinases. *J Virol*. 2011; 85 (1): 21–31. doi: 10.1128/JVI.01814-10.
 27. De Wispelaere M., LaCroix A.J., Yang P.L. The small molecules AZD0530 and dasatinib inhibit dengue virus RNA replication via Fyn kinase. *J Virol*. 2013; 87 (13): 7367–7381. doi: 10.1128/JVI.00632-13.
 28. Adler H., Gould S., Hine P., Snell L.B., Wong W., Houlihan C.F., Osborne J.C., Rampling T., Beadsworth M.B., Duncan C.J., Dunning J., Fletcher T.E., Hunter E.R., Jacobs M., Khoo S.H., Newsholme W., Porter D., Porter R.J., Ratcliffe L., Schmid M.L., Semple M.G., Tunbridge A.J., Wingfield T., Price N.M., NHS England High Consequence Infectious Diseases (Airborne) Network. Clinical features and management of human monkeypox: a retrospective observational study in the UK. *Lancet Infect Dis*. 2022; 22 (8): 1153–1162. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00228-6.
 29. Wattana K., Utrakul S., Leesakulpisut N., Khunkit P. Potential drug interaction between favipiravir and warfarin in patients with COVID-19: a Real-World Observational Study. *J Clin Pharmacol*. 2023; 63 (3): 338–344. doi: 10.1002/jcph.2161.
 30. Karim M., Lo C.W., Einav S. Preparing for the next viral threat with broad-spectrum antivirals. *J Clin Invest*. 2023; 133 (11): e170236. doi: 10.1172/JCI170236.

Информация об авторах

Жданов Константин Валерьевич — д. м. н., профессор, чл.-корр РАН, начальник кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «ВМА им. С. М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-3697-1874

Мальцев Олег Вениаминович — к. м. н., заместитель начальника кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «ВМА им. С. М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6286-9946

Касьяненко Кристина Валерьевна — преподаватель кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «ВМА им. С. М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9294-7346

Козлов Константин Вадимович — д. м. н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «ВМА им. С. М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-4398-7525

Сукачев Виталий Сергеевич — к. м. н., старший преподаватель кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «ВМА им. С. М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0468-0165

Львов Николай Иванович — д. м. н., доцент кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «ВМА им. С. М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-4254-229X

Шарабханов Валерий Валерьевич — к. м. н., старший ординатор клиники кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «ВМА им. С. М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0526-6006.

About the authors

Konstantin V. Zhdanov — D. Sc. in Medicine, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Infectious Diseases (with a course of Medical Parasitology and Tropical Diseases), S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-3697-1874

Oleg V. Maltsev — Ph. D. in Medicine, Deputy Head of the Department of Infectious Diseases (with a course of Medical Parasitology and Tropical Diseases), S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6286-9946

Kristina V. Kasyanenko — Lecturer at the Department of Infectious Diseases (with a course of Medical Parasitology and Tropical Diseases), S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9294-7346

Konstantin V. Kozlov — D. Sc. in Medicine, Associate Professor, Professor at the Department of Infectious Diseases (with a course of Medical Parasitology and Tropical Diseases), S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-4398-7525

Vitalii S. Sukachev — Ph. D. in Medicine, Senior Lecturer at the Department of Infectious Diseases (with a course of Medical Parasitology and Tropical Diseases), S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0468-0165

Nikolai I. Lvov — D. Sc. in Medicine, Associate Professor at the Department of Infectious Diseases (with a course of Medical Parasitology and Tropical Diseases), S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-4254-229X

Valerian V. Sharabhanov — Ph. D. in Medicine, Chief Resident at the clinic of the Department of Infectious Diseases (with a course of Medical Parasitology and Tropical Diseases), S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0526-6006

Стратегия и тактика антибактериальной терапии госпитальных инфекций в настоящее время: уроки прошедшей пандемии COVID-19

*С. Д. МИТРОХИН¹, А. В. АЛЕШКИН², А. А. ГАЛИЦКИЙ¹, А. С. ШКОДА¹

¹ ГБУЗ «Городская клиническая больница № 67 им. Л. А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

² ФБУН «Московский научно-исследовательский институт им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Present Strategy and Tactics of Antibacterial Therapy for Hospital Infections: Lessons Learned from the COVID-19 Pandemic

*SERGEY D. MITROHIN¹, ANDREY V. ALESHKIN²,
ANTON A. GALITSKY¹, ANDREY S. SHKODA¹

¹ City Clinical Hospital No. 67 named after L. A. Vorokhobov of the Moscow Health Department, Moscow, Russia

² G. N. Gabrichevsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

Резюме

На фоне прошедшей пандемии новой коронавирусной инфекции в России был отмечен значительный рост продаж антибактериальных препаратов в аптечной сети и закупок их лечебными учреждениями системы здравоохранения РФ. Микробиологический мониторинг, проведенный в «ГКБ № 67 им. Л. А. Ворохобова ДЗМ» (Москва) в 2020–2021 гг., выявил наличие актуальной проблемы, заключающейся в том, что от пациентов с инфекциями, связанными с медицинской помощью (ИСМП), теперь выделялись в основном грам-отрицательные бактерии, в пуле которых преобладали штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Как показали фармакоэкономические исследования, проведенные авторами, стоимость одного курса целенаправленной антибактериальной терапии ИСМП в таком случае могла возрастать в 6–12 раз по сравнению с аналогичным курсом терапии при отсутствии выделения как MDR-штаммов, так и XDR-штаммов госпитальных патогенов. Для того, чтобы добиться снижения себестоимости разработанных и применяемых авторами схем антибактериальной терапии, параллельно с разработкой эффективных схем антибактериальной терапии ИСМП, вызванных MDR/XDR-патогенами, проводилось и другое исследование, являющееся продолжением работы по созданию и совершенствованию схем биотерапии ИСМП, а именно разработка схем персонализированной фаготерапии пациентов с госпитальной пневмонией, вызванной штаммами бактерий с МЛУ. В результате полученных авторами данных была предложена и апробирована концепция персонализированного подхода к фаготерапии различных нозологических форм ИСМП у пациентов многопрофильного стационара, обусловленных госпитальными патогенами с МЛУ. В результате использования данной методики эффективность фаготерапии различных нозологических форм ИСМП в «ГКБ № 67 им. Л. А. Ворохобова ДЗМ», вызванной MDR и XDR-штаммами госпитальных возбудителей, повысилась на 30%, а эффективность стартовой схемы антибиотикотерапии, составила >70%. Экономический эффект от сочетания антибиотикотерапии и фаготерапии («бустертерапия») составил >3 000 000 руб. по сравнению с применением только одних антибиотиков при лечении больных с ИСМП, вызванных MDR/XDR-штаммами госпитальных патогенов.

Ключевые слова: ИСМП; госпитальные штаммы с МЛУ; персонализированная фаготерапия; сочетанная антибиотико/фаготерапия ИСМП

Для цитирования: Митрохин С. Д., Аleshкин А. В., Галицкий А. А., Шкода А. С. Стратегия и тактика антибактериальной терапии госпитальных инфекций в настоящее время: уроки прошедшей пандемии COVID-19. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68 (9–10): 72–78. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-72-78>.

Abstract

A significant increase in sales of antibacterial drugs in pharmacies and their purchases by medical institutions of the Russian Healthcare System was observed against the background of the past pandemic of a novel coronavirus infection in Russia. Microbiological monitoring that was carried out at City Clinical Hospital No. 67 named after L. A. Vorokhobov (Moscow) in 2020–2021, revealed a pressing problem — primarily gram-negative bacteria, with a predominance of multidrug-resistant (MDR) strains, were isolated from patients with healthcare-associated infections (HAIs). As shown by

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Саляма Адиля, 2/44, ГКБ № 67, г. Москва, Россия, 123423.
E-mail: s_mitrokhin@mail.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 2/44 Salyam Adil st., City Clinical Hospital No. 67 named after L. A. Vorokhobov, Moscow, 123423 Russia.
E-mail: s_mitrokhin@mail.ru

pharmacoeconomic studies conducted by the authors, the cost of one course of targeted antibacterial therapy for HAI in this case could increase by 6–12 times compared to a similar course of therapy in the absence of both MDR strains and XDR strains of hospital pathogens. In order to achieve a reduction in the cost of antibacterial therapy developed and used by the authors, in addition to the development of effective antibacterial therapy regimens for HAIs caused by MDR/XDR pathogens, another study was carried out as a continuation of the work on creating and improving biopharmaceutical regimens for HAIs, namely the development of personalized phage therapy regimens for patients with hospital-acquired pneumonia caused by MDR bacterial strains. Based on the data obtained, the concept of a personalized approach to phage therapy of various nosological forms of HAIs caused by hospital-acquired MDR pathogens in patients of a multidisciplinary hospital was proposed and tested. As a result of this approach, the effectiveness of phage therapy for various nosological forms of HAIs caused by MDR and XDR strains of hospital pathogens in City Clinical Hospital No. 67 named after L. A. Vorokhobov increased by 30%, and the effectiveness of the initial antibiotic regimen was >70%. The economic effect of the combination of antibiotic therapy and phage therapy («booster therapy») amounted to >3,000,000 rubles, compared with the use of antibiotics alone in the treatment of patients with HAIs caused by MDR/XDR strains of hospital pathogens.

Keywords: HAI; MDR hospital strains; personalized phage therapy; combined antibiotic/phage therapy for HAIs

For citation: Mitrokhin S. D., Aleshkin A. V., Galitsky A. A., Shkoda A. S. Present strategy and tactics of antibacterial therapy for hospital infections: lessons learned from the COVID-19 pandemic. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 72–78. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-72-78>.

Введение

В конце 2019 г. в Китайской Народной Республике произошла вспышка новой коронавирусной инфекции с эпицентром в городе Ухань (провинция Хубэй). Всемирная организация здравоохранения 11 февраля 2020 г. определила официальное название инфекции, вызванной новым коронавирусом — COVID-19 («Coronavirus disease 2019»). Международный комитет по таксономии вирусов 11 февраля 2020 г. присвоил официальное название возбудителю инфекции — SARS-CoV-2. Вызывает очень серьёзное беспокойство тот факт, что на фоне пандемии новой коронавирусной инфекции в России был отмечен значительный рост продажи антибактериальных препаратов в аптеках и закупок их лечебными учреждениями. По данным ряда исследований, более 90% пациентов с COVID-19 получали антибиотики, (в том числе комбинированную терапию и парентеральные препараты) как в стационарных, так и в амбулаторных условиях. Вне всякого сомнения, сложившаяся ситуация поспособствовала значительному росту антимикробной резистентности и имеет серьёзные неблагоприятные последствия в настоящее время. Необоснованная антибактериальная терапия, массово назначавшаяся пациентам с COVID-19 привела к развитию ряда нежелательных явлений (например, появлению штаммов микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ)), которые могут значительно ухудшить прогноз состояния пациента, а порой и привести к развитию жизнеугрожающих последствий [1].

В настоящее время среди штаммов микроорганизмов, демонстрирующих МЛУ, различают [2]:

- MDR — возбудители с множественной лекарственной устойчивостью — резистентные к трём и более классам антибиотиков;

- XDR — возбудители с существенной/экстремальной лекарственной устойчивостью — резистентные ко всем, кроме одного или двух классов антибиотиков;

- PDR — возбудители, устойчивые ко всем известным классам препаратов — панрезистентные возбудители.

Нами ранее были опубликованы результаты исследования [1], где были приведены данные микробиологического мониторинга, проведённого врачами микробиологической лаборатории «ГКБ № 67 им. Л. А. Ворохобова ДЗМ» (Москва) в период пандемии COVID-19 (2020–2021 гг.). Микробиологический мониторинг, проведённый в указанный временной период, выявил наличие актуальной проблемы в нашем стационаре — существенные изменения в больничном пуле бактериальных патогенов, заключающиеся в том, что возбудителями ИСМП оказались грамотрицательные бактерии, в пуле которых присутствовали как MDR-штаммы, так и XDR-штаммы.

Ранее нами также были опубликованы материалы, посвящённые как реализации различных медицинских программ и технологий, направленных на снижение риска появления, накопления и распространения в госпитальной среде стационара MDR или XDR-штаммов бактерий, вызывающих ИСМП [3], так и разработке локальных протоколов как эмпирической, так и целенаправленной антибактериальной терапии тяжёлой внебольничной и госпитальной пневмоний у больных на фоне проходящей пандемии COVID-19 (с учётом высокого риска циркуляции в стационаре MDR/XDR-штаммов бактерий) [1].

В табл. 1 представлены фармакоэкономические аспекты лечения ИСМП у пациентов, stratифицированных с учётом риска MDR/XDR-штаммов бактерий и грибов — по СКАТ [2]. Из данных, представленных в этой таблице видно, что стоимость одного курса терапии антибиотиками у па-

Таблица 1. Фармакоэкономические аспекты лечения ИСМП, вызываемых как штаммами без приобретённой резистентности к антибиотикам, так и MDR/ XDR-штаммами бактерий

Table 1. Pharmacoeconomic aspects of the treatment of HAIs caused by strains without acquired antibiotic resistance and MDR/XDR strains of bacteria

Тип пациента/ Стартовая терапия (по СКАТ)	Суточная стоимость схемы, руб.	Тип пациента/ альтернативная терапия (по СКАТ)	Суточная стоимость схемы, руб.
Тип I	2300,0	Тип I	6594,0
Тип II	4647,0	Тип II	8350,0
Тип IIIa	14394,0	Тип IIIa	22394,0
Тип III b	18778,0	Тип III b	26424,0
Тип IV	27038,0	Тип IV	39627,0

Таблица 2. Статистические и фармакоэкономические показатели антимикробной фармакотерапии ИСМП в отделениях ГКБ № 67 им. Л. А. Ворохобова (2020–2022 гг.)

Table 2. Statistical and pharmacoeconomic indicators of antimicrobial pharmacotherapy for HAIs in the departments of the City Clinical Hospital No. 67 named after L. A. Vorokhobov (2020–2022)

Показатели	2020 г.	2021 г.	2022 г.
Число больных	59560	66032	71337
Средний объём (DDD-индекс) потребления антибиотиков	243,3	437,2	550,4
Затраты, руб.	43 174200,41	41 306534,19	101 014832,72
Стоимость одного дня антибиотикотерапии в больнице, руб.	599,2	625,6	1 588,1

циента четвёртого типа по СКАТ может возрастать в 6–12 раз по сравнению с пациентом первого типа по СКАТ.

В конечном итоге стоимость курса АБ-терапии может достигать до 300 тыс. руб. и более при выделении от больного, например, XDR/PDR-штаммов *Pseudonas aeruginosa* или *Klebsiella pneumoniae*.

В табл. 2 представлены данные по статистическим и фармакоэкономическим показателям лечения госпитальных инфекций в «ГКБ № 67 им. Л. А. Ворохобова ДЗМ» за 2020–2022 гг.

Как видно из приведённых данных табл. 2 в 2022 г. наблюдалось ухудшение определённых фармако-статистических показателей антибактериальной терапии ИСМП по сравнению с аналогичным периодом 2020–2021 гг. И, хотя, в среднем рост числа случаев ИСМП у госпитализированных в отделения больницы пациентов, а также увеличение объёма потребления антибиотиков статистически достоверно не отличались от 2021 г., стоимость одного дня антибиотикотерапии в больнице выросла в 2,5 раза, а общие затраты на приобретение необходимых антибактериальных препаратов для эффективной терапии ИСМП, вызванных штаммами с МЛУ, увеличились, по сравнению с 2021 г., в 2,4 раза и составили более 100 млн рублей.

В то же время такой важный показатель как летальность, являющийся наиболее точным показателем для оценки эффективности лечебного процесса, продемонстрировал устойчивую динамику к снижению в «ГКБ № 67 им. Л. А. Ворохобова ДЗМ» (табл. 3).

Таким образом, мы столкнулись с так называемыми постковидными последствиями, когда

Таблица 3. Показатель летальности в отделениях ГКБ № 67 им. Л. А. Ворохобова в 2020–2022 гг.

Table 3. Mortality rate in departments of the City Clinical Hospital No. 67 named after L. A. Vorokhobov in 2020–2022

Летальность, %		
Реанимации		
2020 г.	2021 г.	2022 г.
17,57	16,31	14,96
Линейные отделения		
2,41	1,61	1,33

в течение двух лет практически повсеместно в стране наблюдалась картина широко масштабного применения антибактериальных препаратов, зачастую с неоправданными показаниями. В результате отделения стационаров заполнились штаммами с МЛУ, а врачи вынуждены переходить от малозатратных, но неэффективных, в данной ситуации схем, на сверхдорогие, но адекватные схемы антибиотиков для того, чтобы спасти жизнь пациенту, лечебный процесс у которого осложнился присоединением ИСМП, вызванного бактериями с МЛУ.

Итак, в постковидном периоде стоимость лечения одного пациента с ИСМП в стационаре теперь, очевидно, будет обходиться отечественному здравоохранению в отдельных случаях сопоставимо с химиотерапией больных с онкопатологией.

Для того, чтобы добиться снижения себестоимости разработанных и применяемых нами схем антибактериальной терапии мы параллельно с разработкой эффективных схем антибактериальной терапии ИСМП, вызванных MDR/XDR-патогенами, мы провели и другое исследование, являющееся продолжением работы по созданию и совершенствованию схем биотерапии ИСМП [4] —

концепции «МИБ — терапия госпитальных инфекций». Данная работа по созданию, разработке и апробации данной медицинской программы была начата коллективом авторов ещё в 2007 г. и проводится по настоящее время [5, 6].

В ходе внедрения концепции в лечебный процесс, мы обратили внимание на такой важный раздел клинической микробиологии, как фаги [6].

Сегодня препараты бактериофагов с успехом применяют для лечения амбулаторных кишечных и респираторных заболеваний, вызванных бактериями родов *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterococcus*. Благодаря узкой специфичности действия, бактериофаги, в отличие от антибиотиков, не угнетают нормальную микрофлору биотопов хозяина, не подавляют иммунной защиты, а также не вызывают аллергизации организма. Возможность преодоления первичной фагоустойчивости бактерий обеспечивает актуальность этой группы препаратов в отношении современных возбудителей гнойно-воспалительных инфекций. Поэтому лечебно-профилактические бактериофаги, как антибактериальные препараты специфической направленности, приобретают всё большую актуальность и востребованность для практического здравоохранения [7, 8].

Цель работы — повышение эффективности профилактических и лечебных мероприятий, направленных на предотвращение циркуляции госпитальных патогенов в отделении реанимации путём использования бактериофагов, активных в отношении полирезистентных штаммов *K.pneumoniae*, *Paeruginosa*, *S.aureus* и *Acinetobacter baumannii*, подобранных в соответствии с индивидуализированным алгоритмом, разработанным Федеральным бюджетным учреждением науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека («ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора»).

Материал и методы

Работа выполнена на базе 2-го отделения анестезиологии — реанимации «ГКБ № 67 им. Л. А. Ворохобова ДЗМ». Персонифицированный подбор бактериофагов проведён на базе «ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора».

В исследование были включены две группы пациентов, общей численностью 20 человек, находившихся на продлённой искусственной вентиляции лёгких в отделении реанимации (РАО №2) «ГКБ № 67 им. Л. А. Ворохобова ДЗМ» в 2022 г.

У пациентов первой группы (10 человек, апрель 2022 г.) была проведена трёхкратная санация полости рта с помощью бактериофагов. Для однократной обработки использовали 20 мл бактериофагового препарата. В табл. 4 представлены данные по исходно контаминированным *K.pneumoniae* локусам.

У пациентов второй группы (10 человек, обследован 21 локус, сентябрь 2022 г.) при проведении микробиологиче-

ского скрининга выявлены грамтрицательные патогены ($n=13$), в том числе:

- *Paeruginosa* — из крови у одного пациентов, у 8 пациентов — из содержимого трахеобронхиального дерева;
- *A.baumannii* — из содержимого трахеобронхиального дерева у одного пациента, у одного пациента — из мочи;
- *K.pneumoniae* — из мочи у двух пациентов.

Все пациенты второй группы получали бактериофаги по 20 мл на приём через зонд внутривентрикулярно в течение пяти дней подряд.

Оценка переносимости бактериофагов, обследование на наличие аллергических реакций, других побочных эффектов в отделении реанимации осуществлялось лечащим врачом-реаниматологом.

Комплексная оценка эффективности использования бактериофагов в рамках наблюдения пациентов в отделении реанимации осуществлялась по данным микробиологического мониторинга и широты выявления грамтрицательных патогенов после курса персонализированной фаготерапии.

Назначение бактериофаговых препаратов проводилось в соответствии с алгоритмом индивидуализированного подбора («дорожной карты»), состоящего из трёх последовательных стадий:

1. Определение чувствительности бактерии-мишени к бактериофагу (с учётом эффективности фаговой инфекции на штамме-возбудителе выделенном от конкретного пациента, а не на бактерии-хозяине).
2. Определение нейтрализующих IgG-антител к используемому бактериофагу в сыворотке пациента с помощью разработанной иммуноферментной тест-системы.
3. Подбор лекарственной формы и пути введения бактериофага на основе проведённых ранее фармакокинетических исследований, а также оптимального для эффективного лизиса бактерии-мишени в очаге инфекции значения множественности инфицирования (отношение титра фагов, содержащихся в препарате с учётом потерь на достижение очага инфекции, к количеству бактерии-возбудителя, высеваемому из очага инфекции должно быть в интервале от 1 до 100).

Для обоснованного и безопасного обновления штаммовых составов фагов, используемых против возбудителей ИСМП, в «ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора» ранее была создана коллекции фено- и генотипически охарактеризованных бактериофагов, включаемых в готовую лекарственную форму по первому требованию стационара.

Результаты и обсуждение

При микробиологическом скрининге первой группы пациентов *K.pneumoniae* высевалась у всех пациентов из эндотрахеального аспирата. Количество случаев успешной эрадикации *K.pneumoniae* с помощью бактериофагов составило 60,0% (см. табл. 4.)

У всех пациентов 2-го РАО из второй группы до начала исследования высевались полирезистентные штаммы грамтрицательных бактерий. Всего обследовали клинический материал из 21 локуса, в 13 (61,9%) из которых идентифицировали:

- *Paeruginosa* — 69,2% (9 из 13 локусов);
- *A.baumannii* — 15,4% (2 из 13);
- *K.pneumoniae* — 15,4% (2 из 13).

В течение пяти дней пациенты получили бактериофаги в зонд.

Ни в одном случае применения бактериофагов не было выявлено токсических и аллергических реакций со стороны пациентов. Патологических

Таблица 4. Результаты санации полости рта с помощью бактериофагов у пациентов 2-го РАО
Table 4. Results of oral cavity sanitation using bacteriophages in patients of the 2nd Reanimation and Anesthesiology Department

Номер пациента	Дата обследования	Локус	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Дата применения бактериофага	Дата повторного обследования	Локус	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1	07.04.2022	ЭТА	+	14.07.2022	21.04.2022	ЭТА	+
2	06.04.2022	ЭТА	+	14.07.2022	15.04.2022	ЭТА	—
3	07.04.2022	ЭТА	+	14.07.2022	15.04.2022	ЭТА	—
4	30.03.2022	ЭТА	+	14.07.2022	14.04.2022	ЭТА	—
5	02.04.2022	ЭТА	+	14.07.2022	15.04.2022	ЭТА	—
6	09.04.2022	ЭТА	+	14.07.2022	24.04.2022	ЭТА	—
7	08.04.2022	ЭТА	+	14.07.2022	15.04.2022	ЭТА	+
8	06.04.2022	ЭТА	+	14.07.2022	24.04.2022	ЭТА	+
9	03.04.2022	ЭТА	+	14.07.2022	28.04.2022	ЭТА	—
10	25.03.2022	ЭТА	+	14.07.2022	15.04.2022	ЭТА	+

Примечание. «+» — наличие *K. pneumoniae*; «—» — отсутствие *K. pneumoniae*; ЭТА — эндотрахеальный аспират.
Note. «+» — presence of *K. pneumoniae*; «—» — absence of *K. pneumoniae*; ETA — endotracheal aspirate.

Таблица 5. Результаты санации локусов пациентов 2-го РАО с помощью бактериофагов
Table 5. Results of sanitization of loci in patients of the 2nd Reanimation and Anesthesiology Department using bacteriophages

Номер пациента	Исследуемый локус	Наличие патогенов	Дата применения бактериофага	Дата повторного обследования	Локус	Наличие патогенов
1	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>	03.09.22	10.09.22	ЭТА	Отсутствие
2	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>	05.09.22	12.09.22	ЭТА	Отсутствие
	Моча	<i>A.baumannii</i>	05.09.22	12.09.22	Моча	Отсутствие
3	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>	05.09.22	12.09.22	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>
4	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>	10.09.22	17.09.22	ЭТА	Отсутствие
	Кровь	<i>Paeruginosa</i>	10.09.22	17.09.22	Кровь	Отсутствие
5	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>	18.09.22	25.09.22	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>
6	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>	14.09.22	21.09.22	ЭТА	Отсутствие
	Моча	<i>K.pneumoniae</i>	14.09.22	21.09.22	Моча	Отсутствие
7	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>	18.09.22	25.09.22	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>
8	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>	13.09.22	20.09.22	ЭТА	<i>Paeruginosa</i>
9	ЭТА	<i>A.baumannii</i>	21.09.22	28.09.22	ЭТА	Отсутствие
10	Моча	<i>K.pneumoniae</i>	07.09.22	14.09.22	Моча	Отсутствие

изменений биохимических показателей крови в связи с использованием бактериофагов так же не наблюдали.

Полная эррадикация патогенов произошла у 6 пациентов из 10, что составило 60% (табл. 5).

Были санированы 9 локусов из 13 (69,2%), в которых до начала применения бактериофагов выявляли отрицательные госпитальные патогены, в том числе:

- 5 из 9 локусов, в которых определяли полирезистентные штаммы *Paeruginosa*;
- 2 из 2 локусов, в которых идентифицировали полирезистентные штаммы *A.baumannii*;
- 2 из 2 локусов, в которых высевались полирезистентные штаммы *K.pneumoniae*.

У второй группы пациентов через сутки после окончания курса персонифицированной фаготерапии были исследованы образцы кала, мочи и ЭТА с целью определения в них штаммов бактериофагов, входящих в препараты. В клиническом материале, полученном у 7 из 10 пациентов, удалось детектировать ряд штаммов бактериофагов, входящих в препараты.

Значительные титры бактериофагов в отдельных локусах коррелировали с уменьшением КОЕ и последующей элиминацией в этих отделах чувствительных к данному фагу полирезистентных штаммов госпитальных патогенов. При повторном обследовании, проведенном через 72 ч после окончания приёма бактериофагов, оригинальные штаммы бактериофагов в клиническом материале пациентов не обнаруживались (чувствительные к данным бактериофагам бактериальные штаммы также отсутствовали).

Заключение

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что такой инновационный подход к элиминации устойчивых штаммов патогенных бактерий, каким является ВМП на основе персонализированной фаготерапии, органично вписывается в рамки разработанной и внедряемой нами медицинской программы — «МИБ-терапия ИСМП», целью которой является снижение риска появления, накопления и распространения в гос-

Таблица 6. Фармакоэкономические аспекты комбинированного (антибиотики + фаги) лечения ИСМП («бустер — терапия»), вызываемых бактериями с различными видами антибиотикорезистентности
Table 6. Pharmacoeconomic aspects of combined (antibiotics + phages) treatment of HAI («booster therapy») caused by bacteria with various types of antibiotic resistance

Тип пациента	Антибактериальная терапия ИСМП (АБ-терапия)		Комбинированная (антибиотики + фаги) терапия — («бустер-терапия») ИСМП		
	Суточные затраты на АБ-терапию, руб.	Затраты на курс АБ-терапии (10 дней), руб.	Затраты а курс персонализированной фаготерапии (5 дней)	Затраты на курс «бустер-терапии» (3+5=8 дней), руб.	Коэффициент снижения затрат при «бустер-терапии»
I–II	≥5 500,00	≥55 000,00	3000,00	≥19 500,00	2,8
III a	≥18 500,00	≥185 000,00	3000,00	≥58 500,00	3,2
III b–IV	≥30 000,00	≥300 000,00	3000,00	≥93 000,00	3,2

питательной среде стационара MDR- или XDR-штаммов бактерий.

По итогам проведённой работы было доказано, что для персонализированной фаготерапии должны использоваться бактериофаги, входящие в зарегистрированные в установленном законом порядке лекарственные препараты, активные в отношении ведущих возбудителей ИСМП (препараты произведены в период не ранее двух лет до момента проводимой фаготерапии). В нашем исследовании все фаги в рамках коллекционного депонирования в «ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора» прошли дополнительные микробиологические и молекулярно-генетические исследования (полногеномное секвенирование с последующим биоинформатическим анализом), исключающие наличие в препарате умеренных бактериофагов, а также фармакокинетические испытания на лабораторных животных. Стерильные фильтраты фаголизатов были подвергнуты контролю на содержание эндотоксина (не более 50 ЕЭ/мл).

В результате использования данной методики эффективность фаготерапии различных нозологических форм ИСМП в нашей больнице, вы-

званной MDR- и XDR-штаммами госпитальных возбудителей, повысилась на 30%, а эффективность стартовой схемы антибиотикотерапии, составила 70% и более.

Экономический эффект от сочетания антибиотикотерапии и фаготерапии («бустер-терапия») составил >3 000 000 руб. по сравнению с применением только одних антибиотиков при лечении больных с ИСМП, вызванных MDR/XDR-штаммами госпитальных патогенов.

В табл. 6 представлен разработанный нами, по результатам проведённого исследования, фармакоэкономический показатель, который получил название «коэффициент снижения затрат при «бустер-терапии» ИСМП». Как видно из данных табл. 6., у пациентов с ИСМП, относящихся к 1–2 типу (по СКАТ), он равен 2,8; а у пациентов с ИСМП, относящихся (по СКАТ) к типу 3а и 3б, а также к 4 типу, — уже 3,2.

Таким образом, применение «бустер-терапии» как одного из вариантов «МИБ — терапии» даёт нам снижение себестоимости лечения антибиотиками различных форм госпитальной инфекции в 2,5 и более раз, чем просто назначение только одних антибиотиков.

Литература/References

1. Митрохин С.Д., Орлова О.Е., Янковская О.С., Гостева И.В., Галицкий А.А., Карпова И.В., Ведяшкина С.Г., Шкода А.С. Опыт применения антибактериальной терапии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 на госпитальном этапе лечения (предварительные итоги и рекомендации). Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2022; 24 (2): 181–192. doi: <https://doi.org/10.36488/cmac.2022.2.181-192>. [Mitrokhin S.D., Orlova O.E., Yankovskaya O.S., Gosteva I.V., Galitskiy A.A., Karpova I.V., Vedyashkina S.G., Shkoda A.S. Opyt primeneniya antibakterial'noy terapii u patsientov s novoy koronavirusnoy infektsiej COVID-19 na gospi-tal'nom etape lecheniya (predvaritel'nye itogi i rekomendatsii). Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya. 2022; 24 (2): 181–192. doi: <https://doi.org/10.36488/cmac.2022.2.181-192>. (in Russian)]
2. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: методические рекомендации. Под. ред. С.В. Яковлева, М.В. Журавлевой, Д.Н. Проценко, В.Б. Белобородова. М.: 2016. [Programma SKAT (Strategiya Kontrolya Antimikrobnoy Terapii) pri okazanii statsionarnoy meditsinskoj pomoshchi: metodicheskie rekomendatsii. S.V. Yakovlev, M.V. Zhuravleva, D.N. Protchenko, V.B. Beloborodov (eds.). Moscow: 2016.
3. Митрохин С.Д., Орлова О.Е., Гостева И.В., Шкода А.С. Потребление антимикробных лекарственных средств в стационаре в зависимости от результатов микробиологического мониторинга ИСМП. Антибиотики и химиотер. 2020; 65 (9): 21–27. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-9-10-21-27>. [Mitrokhin S.D., Orlova O.E., Gosteva I.V., Shkoda A.S. Appointment of antimicrobial medications in a Hospital Depending on the results of microbiological monitoring of HAI. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2020; 65 (9): 21–27. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-9-10-21-27>. (in Russian)]
4. Митрохин С.Д. Биотерапия — ответ на проблему глобальной резистентности бактерий к антибиотикам в XXI веке. Вестник Медицинского центра Управделами Президента Республики Казахстан. 2018; 4 (73):109–115. [Mitrokhin S.D. Bioterapiya — otvet na problemu global'noy rezistentnosti bakterij k antibiotikam v KhKhI veke. Vestnik Meditsinskogo tsentra Upravdelami Prezidenta Respubliki Kazakhstan. 2018; 4 (73):109–115. (in Russian)]
5. Митрохин С.Д., Стернин Ю.И. Значимость иммунобиологических препаратов в профилактике инфекций области хирургического вмешательства у онкологических больных. Эффективная фармакотерапия. 2011; 25: 46–52. [Mitrokhin S.D., Sternin Yu.I. Znachimost' immunobiologicheskikh preparatov v profilaktike infektsij oblasti khi-

rurgicheskogo vmeshatel'stva u onkologicheskikh bol'nykh. Effektivnaya Farmakoterapiya. 2011; 25: 46–52. (in Russian)]

6. Митрохин С.Д. Концепция профилактики инфекций области хирургического вмешательства у онкологических больных с использованием иммунобиологических препаратов. Русский медицинский журнал. 2011; 19 (32): 2032–2037. [Mitrokhin S.D. Kontsepsiya profilaktiki infektsij oblasti khirurgicheskogo vmeshatel'stva u onkologicheskikh bol'nykh s ispol'zovaniem immunobiologicheskikh preparatov. Russkij Meditsinskij Zhurnal. 2011; 19 (32): 2032–2037. (in Russian)]
7. Аleshкин А.В., Селькова Е.П., Еришова О.Н., Савин И.А., Шкода А.С., Бочкарева С.С., Митрохин С.Д., Киселева И.А., Орлова О.Е., Рубальский Е.О., Зул'карнаев Э.Р. Концепция персонализированной фаготерапии пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Фундаментальная и клиническая медицина. 2018; 3 (2): 66–74. [Aleshkin A.V., Sel'kova E.P., Ershova O.N., Savin I.A., Shkoda A.S., Bochkareva S.S., Mitrokhin S.D., Kiseleva I.A., Orlova O.E., Rubal'skij E.O., Zul'karneev E.R. Kontsepsiya personalizirovannoj fagoterapii patsientov

otdeleniya reanimatsii i intensivnoj terapii, stradayushchikh infektsiyami, svyazannymi s okazaniem meditsinskoj pomoshchi. Fundamental'naya i Klinicheskaya Meditsina. 2018; 3 (2): 66–74. (in Russian)]

8. Аleshкин А.В., Аleshкин А.В., Еришова О.Н., Бочкарева С.С., Шкода А.С., Вайнштейн И.И., Ведякина С.Г., Митрохин С.Д., Калачева О.С., Орлова О.Е., Киселева О.С., Рубальский Е.О., Зул'карнаев Э.Р. Способ лечения инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи, вызванной возбудителем или возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью. Патент РФ № 2664681 С1; заявл. 06.09.2017. Опубл. 21.08.2018 г. — Бюл. № 24. [Aleshkin A.V., Aleshkin A.V., Ershova O.N., Bochkareva S.S., Shkoda A.S., Vajnshtejn I.I., Vedyashkina S.G., Mitrokhin S.D., Kalacheva O.S., Orlova O.E., Kiseleva O.S., Rubal'skij E.O., Zul'karneev E.R. Sposob lecheniya infektsii, svyazannoj s okazaniem meditsinskoj pomoshchi, vyzvannoj возбуdivitelem ili возбуdiviteleyami s mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivost'yu. Patent RF № 2664681 S1; zayavl. 06.09.2017. Opubl. 21.08.2018 g. — Bjyul. № 24. (in Russian)]

Информация об авторах

Митрохин Сергей Дмитриевич — д. м. н., профессор, заведующий отделом клинической фармакологии городской клинической больницы № 67 им. Л. А. Ворохобова Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-5127-1060

Аleshкин Андрей Владимирович — д. б. н., профессор РАН, член-корр. РАН, заместитель директора по медбиотехнологии Московского научно-исследовательского института им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0532-1378

Галицкий Антон Анатольевич — врач-клинический фармаколог городской клинической больницы № 67 им. Л. А. Ворохобова Департамента здравоохранения г. Москвы; аспирант Московского научно-исследовательского института имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-5022-1475

Шкода Андрей Сергеевич — д. м. н., профессор, главный врач городской клинической больницы № 67 им. Л. А. Ворохобова Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9783-1796

About the authors

Sergey D. Mitrokhin — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology of the City Clinical Hospital No. 67 named after L. A. Vorokhobov, Moscow Health Department, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-5127-1060

Andrey V. Aleshkin — D. Sc. in Biology, Professor of the Russian Academy of Sciences, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Medical Biotechnology, G. N. Gabrichevsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-0532-1378

Anton A. Galitskiy — Clinical pharmacologist at the City Clinical Hospital No. 67 named after L. A. Vorokhobov, Moscow Health Department; graduate student of the G. N. Gabrichevsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-5022-1475

Andrey S. Shkoda — D. Sc. in Medicine, Professor, Chief Physician of the City Clinical Hospital No. 67 named after L. A. Vorokhobov, Moscow Health Department, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-9783-1796

Предикторы эффективности психологического сопровождения основного курса лечения туберкулёза лёгких

*В. М. КОЛОМИЕЦ¹, А. Л. КОВАЛЕНКО², Е. П. ПАВЛЕНКО¹,
А. Ю. ПЕТРОВ³, Е. В. ТАЛИКОВА⁴

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

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

³ ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Ленинградская обл., Орлов Роуш, Россия

⁴ ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург, Россия

Predictors of the Effectiveness of Psychological Support in Addition to the Base Treatment in Pulmonary Tuberculosis

*VLADISLAV M. KOLOMIETS¹, ALEKSEY L. KOVALENKO², ELIZAVETA P. PAVLENKO¹,
ANDREY YU. PETROV³, EKATERINA V. TALIKOVA⁴

¹ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

² Scientific Advisory Center of Toxicology named after S. N. Golikov of the Federal Medical-Biological Agency, Saint Petersburg, Russia

³ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Saint Petersburg, Russia

⁴ Saint Petersburg Medical and Social Institute, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Цель исследования — изучение влияния на психоэмоциональное состояние и приверженность лечению у пациентов с туберкулёзом лёгких включения в схемы сопроводительной терапии ремаксола. **Материал и методы.** Проанализированы данные 326 пациентов (252 мужчин и 74 женщин) с разными формами туберкулёза лёгких, получивших лечение в ОБУЗ «Областной клинический противотуберкулёзный диспансер», средний возраст пациентов составил 41,3±1,6 лет. У пациентов на фоне проведения основного курса этиотропной терапии в основной группе ($n=72$) выявлен низкий уровень приверженности лечению и клинико-лабораторные признаки гепатотоксичности I степени. В связи с этим при психологическом сопровождении основного курса лечения была назначена терапия сопровождения: ремаксол внутривенно капельно по 400 мл через день курс №5, далее — 1 раз в неделю №4. Пациенты группы сравнения ($n=254$) получили стандартное лечение. Помимо стандартного обследования по показаниям у больных в динамике определяли цитокиновый профиль (уровень IL-1 β , 4, 6), TNF- α и IFN- γ). Также в динамике определялся уровень приверженности лечению с помощью тестирования по оригинальной методике. **Результаты.** Выявлено, что при включении в схемы лечения ремаксола, по сравнению со стандартной схемой, отмечена более выраженная положительная динамика клинико-лабораторных данных: уменьшение признаков гепатотоксикоза и тенденция улучшения параметров цитокинового профиля. Это способствовало сохранению схемы этиотропной терапии и улучшению самочувствия пациентов, что в свою очередь повышало уровень приверженности и тем самым эффективность лечения больных. **Выводы.** Совокупность положительных эффектов применения ремаксола у пациентов с туберкулёзом лёгких способствует повышению уровня их психоэмоционального состояния и таким образом повышает приверженность к лечению и его эффективность.

Ключевые слова: туберкулёз; ремаксол; приверженность лечению; лекарственное поражение печени; цитокиновый профиль; эффективность лечения

Для цитирования: Коломиец В. М., Коваленко А. Л., Павленко Е. П., Петров А. Ю., Таликова Е. В. Предикторы эффективности психологического сопровождения основного курса лечения туберкулёза лёгких. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68 (9–10): 79–84. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-79-84>.

Abstract

The aim of the study was to investigate the effect on the psycho-emotional state and adherence to treatment in patients with pulmonary tuberculosis of remaxol inclusion in the accompanying therapy regimens. **Material and methods.** The data from 326 patients (252 men and 74 women) with various forms of pulmonary tuberculosis treated at the Regional Clinical Tuberculosis Dispensary were analyzed; the average age of patients was 41.3±1.6 years. A low level of adherence to treatment, as well as clinical and laboratory signs of grade I hepatotoxicity were revealed in patients receiving a course of etiotropic therapy in the main group ($N=72$). In this regard, in addition to the psychological support for the main course of treatment, accompanying therapy was prescribed: remaxol 400 ml intravenous drip every other day (course No. 5), after-

wards — 1 time a week (course No. 4). Patients in the comparison group ($N=254$) received standard treatment. In addition to the standard examination, the cytokine profile (the level of IL- 1β , 4, 6), TNF- α and IFN- γ) was determined in dynamics according to the indications in patients. The level of adherence to the treatment was also determined in dynamics through testing according to the original methodology. **Results.** The study revealed that the inclusion of remaxol in the treatment regimens facilitated more pronounced positive dynamics in clinical and laboratory data compared with the standard regimen: a decrease in signs of hepatotoxicosis and a tendency towards improvement in cytokine profile parameters. This contributed to maintaining the etiotropic therapy regimen and improving the well-being of patients, which, in turn, increased the level of adherence and therefore the effectiveness of treatment in patients. **Conclusions.** The combination of positive effects of remaxol use in patients with pulmonary tuberculosis contributes to an increase in their psycho-emotional state and thereby increases adherence to treatment and its effectiveness.

Keywords: tuberculosis; remaxol; adherence to treatment; drug-induced liver damage; cytokine profile; treatment effectiveness

For citation: Kolomiets V. M., Kovalenko A. L., Pavlenko E. P., Petrov A. Yu., Talikova E. V. Predictors of the effectiveness of psychological support in addition to the base treatment in pulmonary tuberculosis. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 79–84. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-79-84>.

Введение

Актуальность проблемы туберкулёзной инфекции определяется не только нарушениями физического здоровья, но и существенными изменениями психического состояния пациентов. Изменения эмоциональной сферы могут отягчать течение инфекционного процесса и тем самым ухудшать качество жизни больных и прогноз заболевания. В их основе лежат психологическая реакция на установленный диагноз и опасения социального ущерба в связи с заболеванием. Развивающиеся аффективные нарушения являются не только следствием нозогенной реакции на болезнь, но и объективным отражением тяжести воспалительного процесса. При этом форма туберкулёзного процесса, его распространённость и уровень интоксикации могут не отражать выраженность психологических нарушений [1–4].

Таким образом, лечение туберкулёза в настоящее время — это комплекс мероприятий, сочетающих медикаментозную терапию и при психологическом сопровождении лечения различные психокоррекционные воздействия (РПВ), включая прежде всего психологическое консультирование и психотерапевтическую работу с пациентом [1, 5].

Согласно данным ряда авторов, почти у 90% больных туберкулёзом лёгких на фоне этиотропной терапии (ЭТ) развивается как минимум одна нежелательная побочная реакция (НПР). Среди НПР существенное значение имеют лекарственные поражения печени (ЛПП). Их развитие может приводить к изменениям режима ЭТ и даже к отказу от применения наиболее эффективных по отношению к возбудителю препаратов. Частота ЛПП, по данным ряда авторов, составляет от 1 до 79,9% [6–8].

В связи с этим важным аспектом терапии сопровождения является использование препаратов с гепатопротективными свойствами. Ремаксол (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», г. Санкт-Петербург) — оригинальный инфузионный гепатопротектор, в состав которого входят естественные метаболиты:

янтарная кислота, рибоксин, никотинамид, метионин. Он оказывает антиоксидантное, антигипоксикантное, гепатопротекторное действие, стимулирует синтез эндогенного адеметионина, повышает показатели системы глутатиона, усиливает регенеративные процессы в печени. Препарат хорошо зарекомендовал себя в комплексной терапии туберкулёза и при лечении острых отравлений алкоголем [9–11].

Наличие побочных эффектов может приводить к изменениям схем специфической терапии инфекции, вплоть до временной их отмены, и оказывать дополнительное негативное влияние на психоэмоциональное состояние пациента, изменять уровень его приверженности лечению и тем самым снижать его клиническую и экономическую эффективность, ассоциироваться с риском неудачного лечения и даже летальным исходом заболевания. Своевременная коррекция не только побочных эффектов ЭТ и профилактика их развития, но и психологическая поддержка пациента являются важными задачами фтизиатрии. В связи с этим, на этапе проведения основного курса лечения туберкулёза (ОКЛ/ТБ) в схемы терапии сопровождения, помимо медикаментозного, включено психологическое сопровождение пациентов, основной задачей которого является повышение его приверженности к лечению.

Цель исследования — изучить влияние на психоэмоциональное состояние и приверженность лечению у пациентов с туберкулёзом лёгких включения в схемы сопроводительной терапии ремаксола.

Материал и методы

Проанализированы данные 326 пациентов (252 мужчины и 74 женщины) с разными формами туберкулёза, получивших лечение в ОБУЗ «Областной клинический противотуберкулёзный диспансер», средний возраст пациентов составил $41,3 \pm 1,6$ лет.

Критерии включения: подтверждённый туберкулёз лёгких, назначенное согласно регламентирующим документам ОКЛ/ТБ, наличие признаков ЛПП, подписанное добровольное информированное согласие.

Критерии не включения: внелёгочные формы туберкулёзной инфекции, отягощённый преморбидный фон, отказ от проведения лечения и подписания информированного согласия.

У 217 пациентов туберкулёз был диагностирован впервые, у 34 наблюдался рецидив инфекции и у 75 установлен хронический процесс. По формам туберкулёз разделялся: на очаговый (22 пациента, 6,8%), инфильтративный (119 человек, 36,5%), фиброзно-кавернозный (70 человек, 21,4%) и диссеминированный (115 человек, 35,3%).

У большинства (236 человек; 72,4%) туберкулёз протекал без сопутствующей патологии, у 90 (27,6%) — с сопутствующей патологией, из них у 36 человек была диагностирована хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ).

У 76% наблюдаемых, в том числе у всех из основной группы, при проведении ОКЛ/ТБ ЭТ отмечались клинико-лабораторные признаки ЛПП (иктеричность склер, боли и тяжесть в правом подреберье, гепатомегалия, увеличение уровня трансаминаз). В связи с этим 72 больным (основная группа, I) был назначен ремаксол: внутривенно капельно по 400 мл через день курс №5, далее — 1 раз в неделю №4. Пациентам II группы (сравнения, $n=254$) лечение проводилось согласно регламентирующим документам [5, 6].

Помимо стандартного клинико-лабораторного обследования всем пациентам в динамике (через месяц от начала ОКЛ/ТБ и через 40 дней) в крови определялись уровни аспартатаминотрансферазы (АСТ) и общего билирубина, интерлейкинов (1β, 4, 6), фактора некроза опухоли альфа (TNF-α) и интерферона гамма (IFN-γ), (ИФА, Вектор-Бест, Новосибирск).

В динамике (перед ОКЛ/ТБ и через 40 дней от начала лечения) определялся уровень приверженности к лечению (ПБЛ) по оригинальной методике [12]. Она основана на тестировании пациента с помощью специальной анкеты и позволяет определить наличие факторов риска — стенов (стресс, фрустрация, стигматизация, внушаемость, пристрастие к алкоголю, социально-психологический статус, побочные реакции, отсутствие эффекта лечения, не сложившиеся взаимоотношения с медицинским персоналом, экономическое неблагополучие). В зависимости от количества стенов определялся:

- низкий (неудовлетворительный) уровень приверженности лечению (НУП) (1–2 стенов): склонность к нарушениям режима, отсутствие эффекта лечения, частые рецидивы и обострения;
- удовлетворительный уровень приверженности (УУП) (3–5 стенов): умеренные нарушения режима в экстремальных ситуациях, плохие результаты терапии, редкие рецидивы и обострения
- высокий уровень приверженности (ВУП) (6–10 стенов), который включает как хорошую (возможны единичные кратковременные нарушения больничного режима в экстремальных ситуациях, низкая вероятность рецидивов и обострений), так и высокую приверженность лечению (низкая вероятность нарушений больничного режима, высокая эффективность лечения).

В зависимости от результатов первого тестирования прогнозировалась дальнейшая врачебная тактика, включавшая алгоритмы психологического сопровождения пациентов, с оказанием индивидуальной социально-психологической помощи и медикаментозной терапии по необходимости.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием персонального компьютера и пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для расчёта относительных величин

использовалась поправка Ван дер Вальса. Количественные данные рассчитывались в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, а m — ошибка среднего. Вывод считался статистически достоверным при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Анализ данных историй болезни выявил, что у 172 (52,7%) *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) сохранялась чувствительность ко всем препаратам ЭТ, у 19 (5,8%) культур была отмечена устойчивость к одному (кроме изониазида), у 16 (4,9%) — к нескольким (кроме изониазида и рифампицина), у 94 (28,8%) и 25 (7,6%) культур была выявлена МЛУ и ШЛУ.

С учётом клинико-лабораторных и инструментальных данных были назначены курсы ЭТ: 168 (51,5%) пациентов принимали ЭТ по первому, 35 (10,7%) — второму, 32 (9,8%) — третьему, 85 (26%) — по четвёртому и 6 больным (2%) — по пятому стандартному режиму, ориентированному на рекомендации ВОЗ (программа DOTS и DOTS+) [5, 6].

Через месяц от начала ЭТ у всех пациентов основной группы появились жалобы разной интенсивности — на тяжесть в правом подреберье, снижение аппетита и нарастающую слабость. Объективно были отмечены иктеричность склер (146 больных — 44,7%), увеличение печени и её болезненность при пальпации (278 человек — 85,2%). Увеличение уровня АСТ и общего билирубина соответствовали I степени гепатотоксичности (табл. 1). Полученные данные позволили предположить развитие ЛПП на фоне этиотропной терапии и начать сопроводительную терапию, в том числе у 72 больных — ремаксолом. Все пациенты получили препарат в полном объёме, нежелательных явлений на его введение выявлено не было.

После курса сопроводительной терапии у всех пациентов зарегистрировано улучшение клинико-лабораторных показателей что позволило не вносить изменений в схему ЭТ. Отмечалось улучшение самочувствия, купировалась иктеричность склер, уменьшилась печёночная симптоматика. При этом у пациентов, получивших ремаксол, положительная динамика была более выражена, что можно связать с гепатопротективным действием препарата.

Анализ иммунологических данных пациентов в зависимости от схемы терапии сопровождения

Таблица 1. Динамика показателей АСТ, общего билирубина в зависимости от схемы сопроводительной терапии ($M \pm m$)

Table 1. Dynamics of AST and total bilirubin indicators depending on the accompanying therapy regimen ($M \pm m$)

Показатель	I группа, $n=72$		II группа, $n=254$	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
АСТ	59,3±1,4	42,9±2,1	60,4±1,2	48,7±2,6
Общий билирубин	20,1±3,8	17,4±3,2	19,2±3,1	15,2±1,4

Таблица 2. Динамика иммунологических показателей в зависимости от схемы терапии сопровождения ($M \pm m$, пг/мл)

Table 2. Dynamics of immunological parameters depending on the accompanying therapy regimen ($M \pm m$, pg/ml)

Показатель	IL-6		IL-4		IL-1 β		TNF- α		IFN- γ	
	до	после	до	после	до	после	до	после	до	после
I группа (n=72)	26,8 $\pm$ 4,3	17,5 $\pm$ 1,3	14,4 $\pm$ 2,1	12,6 $\pm$ 1,5	14,7 $\pm$ 3,4	12,9 $\pm$ 0,8	6,5 $\pm$ 1,4	5,8 $\pm$ 0,9	6,7 $\pm$ 2,1	7,3 $\pm$ 0,7
II группа (n=254)	23,8 $\pm$ 1,5	18,2 $\pm$ 1,8	15,7 $\pm$ 1,2	12,5 $\pm$ 0,8	15,8 $\pm$ 1,6	13,4 $\pm$ 1,4	6,9 $\pm$ 0,9	6,1 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 2,5	6,2 $\pm$ 1,8

Таблица 3. Динамика показателей приверженности лечению в зависимости от схемы сопроводительной терапии (абс, %)

Table 3. Dynamics of treatment adherence indicators depending on the accompanying therapy regimen (abs, %)

Показатель	I группа, n=72		II группа, n=254	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
НУП	32 (44,6%)	8 (11,1%)	132 (52,0%)	98 (38,5%)
УУП	30 (41,6%)	45 (62,5%)	103 (40,5%)	133 (52,3%)
ВУП	10 (13,8%)	19 (26,4%)	19 (7,5%)	23 (9,2%)

Примечание. НУП — низкий уровень приверженности лечению; УУП — умеренный уровень приверженности лечению; ВУП — высокий уровень приверженности лечению.

Note. НУП — low level of adherence to treatment; УУП — moderate level of adherence to treatment; ВУП — high level of adherence to treatment.

выявил более выраженную тенденцию улучшения у пациентов основной группы (табл. 2). Изначально в цитокиновой формуле отмечено существенное увеличение уровня провоспалительных цитокинов IL-4,6 и 1 β и низкий уровень IFN- γ . На фоне терапии отмечена положительная тенденция показателей, более выраженная у пациентов, получивших ремаксол: снижение активности провоспалительных интерлейкинов (IL-1 β , 4 и 6) с тенденцией к повышению уровня IFN- γ .

Таким образом, было выявлено, что у пациентов с туберкулёзом лёгких и развившимся на фоне этиотропной терапии лекарственным поражением печени при включении в схему лечения ремаксола, по сравнению со стандартной схемой, отмечена более выраженная положительная динамика клинико-лабораторных данных: уменьшение признаков гепатотоксикоза и улучшение показателей цитокинового профиля.

На фоне лечения у всех пациентов отмечалось улучшение показателей приверженности пациентов лечению, более выраженное в основной группе: доля больных с высоким уровнем приверженности увеличилась с 13,8 до 26,4% в основной группе, при этом в группе сравнения показатель вырос незначительно — с 7,5 до 9,2% ($p > 0,05$) (табл. 3).

Таким образом, включение в схемы психологического сопровождения основного курса лечения как терапии сопровождения различных психокоррекционных воздействий, включая прежде всего психологическое консультирование и психотерапевтическую работу, а у пациентов с признаками ЛПП препарата ремаксол способствовало повышению эффективности лечения за счёт гепатопротективного и иммуногенного эффектов, что в свою очередь влияло на уровень приверженности лечению у больных (табл. 4). Отмечено, что применение препарата у больных с низким уровнем

Таблица 4. Эффективность лечения при различных уровнях приверженности и вариантах терапии сопровождения (в %)

Table 4. Treatment effectiveness at various levels of adherence and accompanying treatment options (%)

Уровни приверженности и методы РПВ	Уровень эффективности							
	ВУЭ		НУЭ		УУЭ		Итог	
	A	%	A	%	A	%	A	%
Всего ВУП	74	78,72	18	19,15	2	2,13	94	100,00
В т. ч. при РПВ	74	78,72	18	19,15	2	2,13	94	100,00
Всего НУП	63	76,83	18	21,95	1	1,22	82	100,00
В т. ч. при РПВ	7	70,00	3	30,00			10	100,00
В т. ч. при ремаксоле	56	77,78	15	20,83	1	1,39	72	100,00
Всего УУП	122	81,33	21	14,00	7	4,67	150	100,00
В т. ч. при РПВ	122	81,33	21	14,00	7	4,67	150	100,00
Итог	259	79,45	57	17,48	10	3,07	326	100,00

Примечание. НУЭ — низкий уровень эффективности лечению; УУЭ — умеренный уровень эффективности лечения; ВУЭ — высокий уровень эффективности лечению.

Note. НУЭ — low level of treatment effectiveness; УУЭ — moderate level of treatment effectiveness; ВУЭ — high level of treatment effectiveness.

нем приверженности и следовательно — прогнозируемым низким уровнем эффективности, позволило достичь повышения его уровня в 77,78% случаев, что существенно выше сравнительно с применением других РПВ — 70,00% ($p > 0,05$).

Обсуждение

По данным ряда авторов [9–11] отмечено, что на фоне применения ремаксола ускоряется переход анаэробных процессов в аэробные, повышается энергообеспечение гепатоцитов, увеличивается синтез макроэргов и увеличивается устойчивость мембран клеток печени к повреждению продуктами перекисного окисления липидов, что способствует восстановлению активности ферментов антиоксидантной защиты. Препарат способствует уменьшению проявлений цитолиза и холестаза. Накоплены данные о гепатопротективном эффекте применения ремаксола у пациентов с туберкулёзом лёгких. Включение препарата в схемы сопроводительной терапии в настоящем исследовании снизило выраженность токсического влияния этиотропной терапии и позволило не вносить изменения в схему лечения.

Установлено, что туберкулезный процесс сопровождается интерлейкин-зависимыми иммунными нарушениями с количественным дисбалансом регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов и выраженными изменениями в системе цитокинов, которые определяют характер воспаления (продуктивный или экссудативный). Продуктивный тип воспаления при туберкулёзе наблюдается при преобладании иммунного ответа по клеточному типу. Отмечено, что активная экспрессия гена IL-6 коррелирует с замедленной динамикой рассасывания инфильтратов в лёгочной ткани и длительным сохранением респираторных жалоб у больных в процессе лечения; экспрессия гена IL-12 — с малым объёмом инфильтратов в лёгочной ткани до лечения; экспрессия гена IL-1β — с

уменьшением сроков ликвидации интоксикации и респираторных жалоб у больных в процессе лечения. Изменения в системе свободно-радикального окисления и антиоксидантной защиты также оказывают влияние на течение туберкулезного процесса [13–15].

Обращает на себя внимание положительная динамика показателей цитокинового профиля у пациентов, получивших курс препарата. Этот факт требует углубленного изучения. В рамках данного исследования он может быть рассмотрен как дополнительный положительный фактор, косвенно повысивший уровень приверженности лечению пациентов. Несомненно, подлежат дальнейшему изучению механизмы воздействия подобных ремаксолу препаратов (гепатопротекторы? иммуностимуляторы? антидепрессанты?) на состояние приверженности больного лечению и тем самым достижению клинического излечения при заболевании туберкулёзом.

Выводы

Включение ремаксола в схемы сопроводительной терапии пациентов с туберкулёзом лёгких повысило эффективность лечения за счёт купирования признаков гепатотоксичности — уменьшения клинико-лабораторных признаков лекарственного поражения печени.

Включение препарата в схемы терапии положительно влияло на цитокиновый профиль пациентов, уменьшение признаков воспаления за счёт уменьшения уровня провоспалительных цитокинов. Этот момент требует более детального исследования.

Положительные эффекты применения ремаксола, как предиктора, в совокупности с психологическим сопровождением этиотропной терапии, оказали положительное влияние на состояние пациентов и повысили уровень их приверженности лечению.

Литература/References

1. Васильева И. А., Самойлова А. Г., Зими́на В. Н., Ловачева О. В., Абрамченко А. В. Химиотерапия туберкулёза в России — история продолжается Туберкулёз и болезни лёгких. 2023; 101 (2): 8–12. doi: <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-2-8-12>. [Vasil'eva I. A., Samojlova A. G., Zimina V. N., Lovacheva O. V., Abramchenko A. V. Khimioterapiya tuberkuleza v Rossii — istoriya prodolzhaetsya Tuberkulez i Bolezni Legkikh. 2023; 101 (2): 8–12. doi: <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-2-8-12>. (in Russian)]
2. Золотова Н. В., Баранова Г. В., Стрельцов В. В., и др. Особенности переносимости противотуберкулёзной химиотерапии с учётом психологического статуса пациентов. Туберкулёз и болезни лёгких. 2017; 4: 15–19. [Zolotova N. V., Baranova G. V., Strel'tsov V. V., i dr. Oso-bennosti perenosimosti protivotuberkuleznoj khimioterapii s uchetom psikhologicheskogo statusa patsientov. Tuberkulez i Bolezni Legkikh. 2017; 4: 15–19. (in Russian)]
3. Стрельцов В. В., Золотова Н. В. Психологическое сопровождение больного туберкулёзом лёгких: анализ случая. Консультативная психология и психотерапия. 2019; 27 (1): 102–118 doi: <http://doi.org/10.17759/cpp.2019270107>. [Strel'tsov V. V., Zolotova N. V. Psikhologicheskoe soprovozhdenie bol'nogo tuberkulezom legkikh: analiz sluchaya. Kon-
4. Alipanah N., Jarlsberg L., Miller C., Linh N.N., Falzon D., Jaramillo E., Nahid P. Adherence interventions and outcomes of tuberculosis treatment: A systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. PLoS Med. 2018 Jul 3; 15 (7): e1002595. doi: 10.1371/journal.pmed.1002595. eCollection 2018 Jul.
5. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
6. Приказ МЗ РФ от 29.12.2014 г. № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулёза органов дыхания» М.: 215. [Prikaz MZ RF ot 29.12.2014 g. № 951 «Ob utverzhdenii metodicheskikh rekomendatsij po sovershenstvovaniyu diagnostiki i lecheniya tuberkuleza organov dykhaniya» Moscow: 215. (in Russian)]
7. Долгушина А. И., Волчегорский И. А., Новоселов П. Н., Ушкарева Э. В., Олевская Е. Р., Кузнецова А. С. Гепатотоксичность противотуберкулёзных препаратов. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018; 156 (8): 116–124. doi: <http://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-156-8-116-124>. [Dolgushina A. I., Volchegorskij I. A., Novoselov P. N., Ushkareva E. V., Olevskaya E. R., Kuznetsova A. S. Gepato-

- toksichnost' protivotuberkuleznykh preparatov. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya. 2018; 156 (8): 116–124. doi: <http://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-156-8-116-124>. (in Russian)]
8. Yew W.W., Chang K.C., Chan D.P. Oxidative stress and first-line antituberculosis drug-induced hepatotoxicity Antimicrob Agents Chemother. 2018 Jul 27; 62 (8): e02637–17. doi: 10.1128/AAC.02637-17. Print 2018 Aug
 9. Ильченко Л. Ю., Оковитый С. В. Ремаксол: механизмы действия и применение в клинической практике. Архив внутренней медицины. Специальный выпуск. 2016; 1–14. [Il'chenko L. Yu., Okovityj S. V. Remaksol: mekhanizmy dejstviya i primeneniye v klinicheskoy praktike. Arkhiv Vnutrennej Meditsiny. Spetsial'nyj Vypusk. 2016; 1–14. (in Russian)]
 10. Волчегорский И. А., Новоселов П. Н., Ушкарева Э. В. Влияние ремаксола на эффективность стандартного лечения больных инфилтративным туберкулезом лёгких. Терапевтический архив. 2016; 3: 73–78. [Volchegorskij I. A., Novoselov P. N., Ushkareva E. V. Vliyaniye remaksola na effektivnost' standartnogo lecheniya bol'nykh infil'trativnym tuberkulezom legkikh. Terapevticheskij Arkhiv. 2016; 3: 73–78. (in Russian)]
 11. Шурыгин А. А., Алексеева Ю. А. Эффективность применения ремаксола в терапии поражений печени, вызванных приёмом противотуберкулёзных препаратов. Фтизиатрия и пульмонология. 2016; 1: 51–53. [Shurygin A. A., Alekseeva Yu. A. Effektivnost' primeneniya remaksola v terapii porazhenij pečeni, vyzvannykh priemom protivotuberkuleznykh preparatov. Ftiziatriya i Pul'monologiya. 2016; 1: 51–53. (in Russian)]
 12. Патент на изобретение России RU № 2611398 «Способ повышения эффективности лечения больных туберкулёзом» 21.02.2017. RU № 2611398. [Patent na izobretenie Rossii RU № 2611398 «Sposob povysheniya effektivnosti lecheniya bol'nykh tuberkulezom» 21.02.2017. RU № 2611398. (in Russian)]
 13. Boni F.G., Hamdi I., Koundi L.M., Shrestha K., Xie J. Cytokine storm in tuberculosis and IL-6 involvement Infect Genet Evol. 2022 Jan; 97: 105166. doi: 10.1016/j.meegid.2021.105166. Epub 2021 Nov 30.
 14. Тарасова Л. Г., Стрельцова Е. Н., Кантемирова Б. И., Галимзянов Х. М., Касимова Н. Б. Цитокиновый профиль у больных туберкулёзом лёгких. Астраханский медицинский журнал. 2016; 11 (2): 84–92. [Tarasova L. G., Strel'tsova E. N., Kantemirova B. I., Galimzyanov Kh. M., Kasimova N. B. Tsitokinovyyj profil' u bol'nykh tuberkulezom legkikh. Astrakhanskij Meditsinskij Zhurnal'yu. 2016; 11 (2): 84–92. (in Russian)]
 15. Мезенцева М. В., Стаханов В. А., Захарова М. В., Зотова И. Ф., Трегубова М. И., Шаповал И. М. Цитокины как маркеры развития инфилтративного туберкулёза лёгких. Инфекции и иммунитет. 2011; 1 (4): 367–372. [Mezentseva M. V., Stakhanov V. A., Zakharova M. V., Zotova I. F., Tregubova M. I., Shapoval I. M. Tsitokiny kak markery razvitiya infil'trativnogo tuberkuleza legkikh. Infektsii i Immunitet. 2011; 1 (4): 367–372. (in Russian)]

Информация об авторах

Коломиец Владислав Михайлович — д. м. н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Курск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2164-8290. ResearcherID: F-2665-2018. eLIBRARY SPIN-код: 186464

Коваленко Алексей Леонидович — д. б. н., к. х. н., лауреат Государственной премии в области науки и техники, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3695-2671

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

Петров Андрей Юрьевич — к. фарм. н., лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники, научный сотрудник, ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константина» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Ленинградская обл., Гатчина, Орлова Роща. ORCID ID: 0000-0001-6204-0145

Таликова Екатерина Владимировна — к. м. н., доцент кафедры морфологии, патологии и судебной медицины ЧОУ ВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0001-6509-9425

About the authors

Vladislav M. Kolomiets — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology, and Phthi-siopulmonology, Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2164-8290. ResearcherID: F-2665-2018. eLIBRARY SPIN: 186464

Aleksey L. Kovalenko — D. Sc. in Biology, Ph. D. in Chemistry, twice winner of the State Prize in Science and Technology, Leading Researcher of the Scientific Advisory Center of Toxicology named after S. N. Golikov of the Federal Medical-Biological Agency, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3695-2671

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

Andrey Yu. Petrov — Ph. D. in Pharmacological Sciences, laureate of the Russian Government Prize in the field of science and technology, researcher at the Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Leningrad region, Orlova Roshcha, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6204-0145

Ekaterina V. Talikova — Ph. D. in Medicine, Associate Professor at the Department of Morphology, Pathology, and Forensic Medicine, Saint Petersburg Medical and Social Institute, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6509-9425

Кардиотоксичные лекарственные средства при лечении COVID-19

*А. С. ЗМИТРУКЕВИЧ^{1,2}, А. Е. МАМЕДОВА³

¹ ГБУЗ города Москвы «Городская поликлиника № 11 ДЗМ», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» МЗ РФ, Москва, Россия

³ Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Cardiotoxic Drugs Used in the Treatment of COVID-19

*ANDREI S. ZMITRUKOVICH^{1,2}, ANASTASIYA E. MAMEDOVA³

¹ City Clinic No. 11 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Grodno State Medical University, Grodno, the Republic of Belarus

Резюме

Актуальность. Пандемия COVID-19 вызвана вирусом SARS-CoV-2. Кардиотоксичному потенциалу лекарственных средств, используемых при лечении COVID-19, уделяется недостаточное внимание. **Цель.** Краткий отчет о влиянии на сердечно-сосудистую систему организма наиболее распространенных препаратов при лечении COVID-19. **Обсуждение.** Для лечения заболевания COVID-19 использовались разные лекарственные средства. Среди наиболее распространенных препаратов стоит выделить гидроксихлорохин, ремдесивир, фавипиравир, фторхинолоны, интерферон-α2b, глюкокортикоиды, молнупиравир и ритонавир/нирматрелвир. Большинство препаратов способны вызывать изменения со стороны сердечно-сосудистой системы, особенно изменение интервала QT. **Заключение.** Врачи должны учитывать кардиотоксичный потенциал всех лекарственных средств, используемых при лечении COVID-19. Терапевты и врачи общей практики должны знать о сердечно-сосудистых рисках при ведении пациентов с COVID-19, а также диспансеризации населения.

Ключевые слова: COVID-19; гидроксихлорохин; глюкокортикоиды; интерферон; ремдесивир; фавипиравир; фторхинолоны

Для цитирования: Змитрукевич А. С., Мамедова А. Е. Кардиотоксичные лекарственные средства при лечении COVID-19. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68 (9–10): 85–92. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-85-92>.

Abstract

Background. The COVID-19 pandemic is caused by the SARS-CoV-2 virus. Insufficient attention is paid to the cardiotoxic potential of the drugs used in the treatment of COVID-19. **Aim.** A brief report on the effect of the drugs commonly used in the treatment of COVID-19 on the cardiovascular system. **Discussion.** Various medications have been used to treat COVID-19. Some of the most common drugs include hydroxychloroquine, remdesivir, favipiravir, fluoroquinolones, interferon-α2b, glucocorticoids, molnupiravir, and ritonavir/nirmatrelvir. Most medications can cause changes in the cardiovascular system, especially in the QT interval. **Conclusions.** Physicians should take into account the cardiotoxic potential of all medications used in the treatment of COVID-19. Therapists and general practitioners should be aware of cardiovascular risks in the management of patients with COVID-19, as well as the prophylactic medical examinations of the population.

Keywords: COVID-19; glucocorticoids; hydroxychloroquine; interferon; remdesivir; favipiravir; fluoroquinolones.

For citation: Zmitrukevich A. S., Mamedova A. E. Cardiotoxic drugs used in the treatment of COVID-19. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (9–10): 85–92. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-85-92>.

Введение

Новый коронавирус SARS-CoV-2 является причиной заболевания COVID-19. Первоначально вирус был выявлен 12 декабря 2019 г. в городе Ухань, Китай [1]. Пандемия COVID-19 была объявлена Всемирной организацией здравоохранения 11 марта 2020 г.

Множество данных подтверждают связь COVID-19 с патологией сердечно-сосудистой си-

стемы организма [2]. Наиболее частой причиной сердечно-сосудистых осложнений при COVID-19 является диссеминированная эндотелиопатия. Однако используемые при лечении COVID-19 лекарственные средства нередко являются кардиотоксичными.

В настоящем обзоре приведены данные о кардиотоксичном потенциале наиболее распространенных лекарственных средств при лечении COVID-19.

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Кравченко, д.14, Городская поликлиника № 11, г. Москва, Россия, 119331.
E-mail: andrey1881889@gmail.com

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 14 Kravchenko str., Moscow, 119331 Russia. E-mail: andrey1881889@gmail.com

Материал и методы

Поиск статей и прочей литературы производился в PubMed, Google Scholar, eLibrary. Ключевыми словами при поиске информации стали: «COVID-19»; «SARS-CoV-2»; «Гидроксихлорохин»; «Глюкокортикоиды»; «Интерферон»; «Ремдесивир»; «Фавипиравир»; «Фторхинолоны»; «Hydroxychloroquine»; «Glucocorticoids»; «Interferon»; «Remdesivir»; «Favipiravir»; «Fluoroquinolones». Подбор источников информации ограничен временным интервалом (с 01.04.2022 г. по 31.06.2022 г.). В отчёт включены ретроспективные исследования, метаанализы, клинические рекомендации, систематические обзоры, описанные случаи заболеваний, ретроспективные исследования, базы данных, посвящённых кардиотоксичным лекарственным средствам и COVID-19. Врачи имеют опыт всесторонней и критической оценки литературы. Поэтому при поиске литературы оценивались исследования специалистов большого спектра профилей. Обзор литературы был ограничен опубликованными на русском и английском языках исследованиями. В общей сложности проанализировано более 250 источников информации, при этом отобрано 60.

Обсуждение

В качестве причин развития множества сердечно-сосудистых изменений при COVID-19 особую роль занимают кардиотоксичные препараты. Наиболее частым побочным эффектом кардиотоксичных препаратов, используемых при COVID-19, является изменение интервала QT. Опасные для жизни аритмии могут быть вызваны удлинением интервала QT [3]. Важно учитывать особенности некоторых лекарственных средств при лечении пациентов с COVID-19. Некоторые препараты уже запрещено использовать при COVID-19, однако с последствиями их приёма до сих пор сталкиваются врачи.

Хлорохин и его аналог гидроксихлорохин. Хлорохин и его аналог гидроксихлорохин долгое время используется в качестве профилактики и лечения малярии во многих странах мира. Известен хлорохин с 1934 г. Гидроксихлорохин (хлорохин) обладает интересными биохимическими свойствами. Касаясь COVID-19 рассмотрим 2 основных свойства данного препарата.

Противовирусное воздействие. В результате множества исследований доказано, что хлорохин (гидроксихлорохин), ингибируя pH-зависимые стадии репликации некоторых вирусов, может быть использован против заболеваний, вызванных ретровирусами [4], вирусами гриппа [5] и коронавирусами [6]. На клеточном уровне хлорохин и гидроксихлорохин накапливаются во внутриклеточных везикулах (эндосомы и лизосомы), где они протонируются, что приводит к повышению pH везикул. При этом доказано, что гидроксихлорохин более эффективный, чем хлорохин [7]. В контексте COVID-19 гидроксихлорохин влияет на SARS-CoV-2, вероятно, через воздействие на pH эндосом и возникающее в результате этого ингибирование гликозилирования рецепторов ангиотензинпре-

вращающего фермента 2, которые необходимы для проникновения вируса [8].

Противовоспалительное и иммуномодулирующее действие. Гидроксихлорохин не так давно обрёл новую жизнь в качестве противоревматического препарата при лечении системной красной волчанки, ревматоидного артрита и прочих аутоиммунных заболеваний [9].

Данные препараты использовались в качестве этиотропной и патогенетической терапии COVID-19 в большинстве стран мира в начале пандемии. Гидроксихлорохин изучался более широко, чем хлорохин. К тому же, при лечении COVID-19 гидроксихлорохин использовался как отдельно, так в сочетании с азитромицином. Азитромицин является макролидным антибиотиком, обладающим, в том числе, иммуномодулирующими и противовирусными свойствами. Иммуномодулирующее и противовоспалительное свойства характеризуются снижением выработки провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-8, ИЛ-6, ФНО- α , а также уменьшением окислительного стресса и модулированием функции Т-хелперов [10].

Гидроксихлорохин способен вызывать лизосомальную дисфункцию с накоплением патологических продуктов обмена, которые можно увидеть в ультраструктурной гистологии как патогномоничные цитоплазматические включения. Хорошо известен токсический эффект гидроксихлорохина в виде ретинопатии. Однако у гидроксихлорохина есть ряд побочных эффектов на сердечно-сосудистую систему. Они включают нарушения проводимости (блокада ветвей пучка, атриовентрикулярная блокада) и кардиомиопатию — часто с гипертрофией, ограничительной физиологией и застойной сердечной недостаточностью [11]. Блокада натриевых и калиевых каналов может привести к удлинению интервала QT на ЭКГ, что в последующем может привести к нарушению ритма сердца, в том числе фибрилляции предсердий.

Другие побочные эффекты включают задержку проводимости сердца, а также снижение сократительной способности из-за отрицательного инотропного эффекта. Эти эффекты могут привести к глубокой гипотензии, нарушениям ритма и сердечно-сосудистому коллапсу [12]. В результате систематического обзора 86 статей, нарушение проводимости является самым частым побочным эффектом гидроксихлорохина (хлорохина), что составляет 85% от всех сердечно-сосудистых осложнений. Другие неспецифические побочные сердечные явления включали гипертрофию желудочков (22%), гипокинезию (9,4%), сердечную недостаточность (26,8%), лёгочную артериальную гипертензию (3,9%) и клапанную дисфункцию (7,1%) [13]. Гидроксихлорохин, хлорохин

и/или азитромицин при лечении COVID-19 зачастую были связаны с удлинением интервала QT, однако не приводили к фатальным аритмиям [14].

Исследования проводились по всему миру. Некоторые подтверждали эффективность гидроксихлорохина, в том числе в комбинации с азитромицином [15], однако есть ряд исследований опровергающих пользу вышеуказанных препаратов при лечении COVID-19 [16]. В результате проведённых многочисленных исследований ВОЗ исключила хлорохин и гидроксихлорохин из списка рекомендуемых препаратов для лечения COVID-19.

Фторхинолоны. Особо важным классом антибактериальных препаратов широкого спектра действия, особенно в период пандемии COVID-19, является фторхинолоны. Они широко используются в качестве противомикробных средств для лечения бактериальных инфекций, включая вторичные в контексте вирусных инфекций. Существует гипотеза, согласно которой фторхинолоны могут связываться с вирусными нуклеиновыми кислотами или нуклеиновыми комплексами. Действительно, есть данные, подтверждающие эффективность фторхинолонов против вируса осповакцины и паповавирусов. Введение арильной группы в пиперазидную часть фторхинолона изменило активность с антибактериальной на противовирусную со специфическим действием против вируса иммунодефицита человека [17].

Есть также исследования на предмет противовирусной активности хинолина и хинолонов в отношении вируса Эбола [18]. Благодаря способности ингибировать репликацию вируса гепатита С, предположительно путём нацеливания на геликазу NS3 вируса, фторхинолоны могут быть перспективными для лечения вирусного гепатита С [19]. Изучая эффективность препарата левофлоксацин в отношении повреждения лёгких, вызванных вирусом гриппа, группа авторов предположила, что фторхинолоны могут ослаблять повреждения лёгких путём ингибирования образования активных форм кислорода и оксида азота (NO), производимых нейтрофилами [20]. Примечательно, что фторхинолоны обладают противовоспалительным свойством за счёт ингибирования провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 и ФНО- α [21].

Фторхинолоны также тестировались в отношении COVID-19. Есть данные, подтверждающие высокую способность ципрофлоксацина и моксифлоксацина связываться с основной протеазой COVID-19 (Mpro). Причём способность фторхинолонов связываться с активным центром белка оказалась выше, чем у хлорохина и нелфинавира [22]. Учитывая иммуномодулирующие свойства респираторных фторхинолонов, наряду с их потенциальной противовирусной активностью

против SARS-CoV-2, а также относительно хорошим профилем безопасности, данные препараты рекомендованы в качестве вспомогательных средств при лечении пациентов с COVID-19 [23].

Однако известны и побочные эффекты от использования фторхинолонов. Особый интерес вызывает способность хинолонов удлинять интервал QT, особенно это касается препарата моксифлоксацин. Левофлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин и гемифлоксацин связаны с более низким риском удлинения интервала QT и наименьшей частотой пируэтных тахикардий (Torsade de pointes) [24]. Удлинение интервала QT обычно связано с ингибирующей активностью фторхинолонов к связанному с эфиром человеческого геном (hERG), ингибирующего калиевые каналы. Эксперименты показали, что фторхинолоны, как и гидроксихлорохин, могут связываться с hERG и ингибировать отток ионов калия преимущественно на стадии реполяризации [25].

Невзирая на то, что частота побочных явлений при использовании фторхинолонов невелика, однако в рутинной клинической практике, особенно при ограничении средств и времени на обследования пациентов с COVID-19 во время пандемии, препараты могут влиять на сердечный ритм, особенно у пациентов с высоким риском.

Ремдесивир. Ремдесивир — нуклеотид-аналоговый ингибитор РНК-полимераз — обладает противовирусной активностью широкого спектра действия против РНК-вирусов. Эффективность ремдесивира больше исследовалась на вирусах Эбола и MERS-CoV.

Неструктурный белок коронавируса Nsp12 (праймер-зависимая RdRp) высококонсервативен, что делает его привлекательной мишенью для противовирусных препаратов широкого спектра действия. Ремдесивир представляет собой фосфорамидатный пролекарственный препарат аналога 1'-цианозамещённого нуклеозид (GS-441524). В отношении РНК-вирусов: ремдесивир ингибирует их репликацию конкурируя с эндогенными нуклеотидами за включение в реплицирующуюся РНК вируса с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp). Внутри клеток ремдесивир подвергается быстрому метаболическому превращению внутриклеточными киназами в его активный метаболит нуклеозидтрифосфат (GS-443902) [26].

В мае 2022 года экспериментальный препарат ремдесивир получил разрешение на экстренное применение в США для пациентов, госпитализированных с тяжёлой формой COVID-19. В последующем ремдесивир начал использоваться во многих странах мира.

Несмотря на широкое применение ремдесивира в качестве противовирусного препарата при COVID-19, нет достаточного количества данных о

побочных эффектах препарата на сердечно-сосудистую систему. В результате исследования *in vitro* авторы [27] продемонстрировали выраженное сродство ремдесивира к человеческим кардиомиоцитам с более высокими локальными концентрациями и активностью. Этим можно объяснить проаритмическую активность ремдесивира. Во время эпидемии лихорадки Эбола в 2016 г. проведено рандомизированное контролируемое исследование с участием 681 инфицированного различными противовирусными препаратами, включая ремдесивир. Был зарегистрирован случай артериальной гипотензии и остановки сердца, произошедший во время введения нагрузочной дозы ремдесивира [28].

Сообщается о ряде случаев развития брадикардии во время приёма ремдесивира. Причём развитие брадикардии при использовании ремдесивира не имело связи с параллельным приёмом катехоламинов [29]. Также есть данные о развитии бессимптомной синусовой брадикардии с ЧСС до 50 ударов в минуту у трёх из 4 наблюдаемых детей с COVID-19 на фоне приёма ремдесивира, но, к счастью, ЧСС нормализовалась после отмены данных препаратов [30]. Описан случай развития брадикардии с признаками удлинения интервала QT после начала приёма ремдесивира с последующей нормализацией состояния на фоне отмены препарата [31]. Несмотря на большое количество описанных случаев развития брадикардии на фоне приёма ремдесивира, тяжёлых сердечно-сосудистых событий не наблюдалось.

Фавипиравир. Фавипиравир является относительно новым противовирусным препаратом, который изначально использовался против вирусов гриппа. Механизм действия данного препарата до конца не изучен. Предполагается, что фавипиравир воздействует на РНК-зависимую РНК-полимеразу вирусов. В результате многочисленных исследований установлено, что фавипиравир индуцирует высокую частоту мутаций РНК вируса, которые генерируют нежизнеспособные вирусные фенотипы. Таким образом мутагенез является одним из основных противовирусных механизмов действия фавипиравира. Данный принцип объясняет широкий спектр противовирусной активности препарата [32].

Что касается COVID-19, то наряду с повышенной частотой мутаций фавипиравир воздействует на SARS-CoV-2 за счёт цитопатического эффекта, который индуцируется вирусом, а также уменьшения количества вирусной РНК и инфекционных частиц [33]. Во многих странах мира, таких как: Россия, Япония, Саудовская Аравия, Таиланд, Кения, некоторые штаты Индии — применение препарата фавипиравир при лечении лёгкой и средней степени тяжести COVID-19 было одобрено.

В некоторых исследованиях было установлено, что в сравнении с гидроксихлорохином, умифеновиром, интерфероном- α фавипиравир показал более высокую эффективность при лечении лёгкой и средней степени тяжести COVID-19 [34].

Описаны и побочные эффекты препарата, например: тератогенное и эмбриотоксическое действие, гиперурикемия, гепатотоксичность и прочие [35]. Однако препарат недостаточно широко изучен в контексте COVID-19. В виду того, что фавипиравир при лечении COVID-19 используется в высоких дозах, то предварительно о побочных эффектах можно говорить исходя из опыта использования препарата при лечении лихорадки Эбола. Исследования, изучающие влияние фавипиравира на блокаду hERG, показали, что при средних терапевтических дозах препарата наблюдалось умеренное подавление тока hERG. Это означает, что имеется высокий риск появления побочного эффекта в виде удлинения интервала QT при использовании фавипиравира в высоких дозах [36]. Были описаны случаи удлинения интервала QT при лечении лихорадки Эбола [37].

Интерферон- α 2b. Интерфероны (ИФН) представляют собой эффекторы врождённых и адаптивных иммунных реакций, связанных с развитием ряда иммунных клеток. ИФН активируют иммунные клетки для реагирования на патогены, раковые заболевания и прочие повреждения. ИФН делятся на 3 типа: тип I ($-\alpha$, $-\beta$, $-\delta$, $-\epsilon$, $-\zeta$, $-\kappa$, $-\tau$ и $-\omega$), тип II ($-\gamma$) и тип III ($-\lambda 1$, $-\lambda 2$, $-\lambda 3$).

Интерфероны способны блокировать транскрипцию и репликацию вирусов. Однако вирусы способны кодировать белки, которые противодействуют реакции ИФН типа I типа. ИФН типа I непосредственно ингибируют репликацию SARS-CoV перекрывая ингибирующие эффекты кодируемых вирусом факторов Nsp1, Nsp3, ORF6 и ORF3b. В этом заключается противовирусное свойство ИФН- α . Что касается иммуномодулирующего свойства, то ИФН оказывают разнообразное воздействие на иммунную систему. Помимо индукции противовирусных интерферон-стимулированных генов, ИФН типа I влияют на обновление и пролиферацию гемопоэтических стволовых клеток, регулируют экспрессию хемокинов и рецепторов клеточной адгезии, регулируют выживание и активацию врождённых и адаптивных иммунных клеток, регулируют эффекторные и запоминающие CD4+ и CD8+ Т-клетки [38]. Ввиду отсутствия большинства вакцин или специфического для патогена противовирусного средства, а также учитывая прямое и косвенное противовирусное свойство, ИФН типа I могут быть хорошими кандидатами на противовирусные препараты широкого спектра действия.

ИФН- α 2b стал широко использоваться при лечении пациентов с COVID-19. Лечение ИФН- α 2b значительно уменьшало продолжительность об-

наруживаемого вируса в верхних дыхательных путях и одновременно снижало повышенные уровни ИЛ-6 и С-реактивного белка в крови [39]. Также установлено, что благоприятные клинические реакции возможны только при введении ИФН- α 2b в ранней стадии COVID-19 [40]. На основании экспериментальных данных в отношении культуры клеток Vero C1008 ИФН- α 2b полностью подавляет репродукцию SARS-CoV-2 через 2 ч после инфицирования и за 24 ч до инфицирования. Поэтому ИФН- α 2b может быть перспективным препаратом для профилактики и лечения COVID-19, особенно в интраназальной форме [41]. Препараты на основе ИФН- α 2b были предложены для включения в схему лечения беременных с COVID-19.

Однако описан ряд побочных эффектов ИФН- α 2b. Так, например, установлена связь ИФН- α 2b со снижением уровня гемоглобина при лечении тяжёлых пациентов с COVID-19 [42]. Есть данные о негативном влиянии ИФН на сердечно-сосудистую систему. Токсичность ИФН зависит от следующих факторов: доза, тип ИФН, возраста пациента, наличия поражения сердца до начала терапии. ИФН способен вызывать: наджелудочковую и желудочковую аритмию, перикардит [43], дилатационную кардиомиопатию, ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда и внезапную смерть [44]. Обобщая 44 нежелательных явления со стороны сердечно-сосудистой системы при лечении ИФН- α исследователи заметили, что чаще всего встречались желудочковые аритмии (58%), далее острый коронарный синдром (21%), кардиомиопатия (12%) [45]. В частности, описан случай нарушения атриовентрикулярной проводимости в виде АВ-блокады второй степени во время терапии ИФН с последующей имплантацией кардиостимулятора [46]. Также известен случай перикардита, вызванного терапией ИФН- α у молодой женщины без предшествующей сердечной патологии.

Особенностью большинства исследований является тот факт, что ИФН- α исследовался при лечении вирусного гепатита С и злокачественных новообразований, где требуются более высокие дозы препараты и продолжительность использования. У большинства пациентов ИФН-индуцированные изменения со стороны сердечно-сосудистой системы проходят после прекращения терапии.

Глюкокортикоиды. Кортикостероиды представляют собой класс вырабатываемых корой надпочечников стероидных гормонов, которые участвуют в широком спектре физиологических функций, включая иммунный ответ, регуляцию воспаления, метаболизм, электролитный баланс, стресс и поведение. Выделяют два основных класса кортикостероидов: глюкокортикоиды (кортизол) и минералокортикоиды (альдостерон). Кортикостероиды показаны при лечении

большого спектра патологических состояний: аллергические заболевания (бронхиальная астма, контактный дерматит, ангионевротический отёк, пневмонит), эндокринные заболевания (болезнь Аддисона, надпочечниковая недостаточность), желудочно-кишечные расстройства (язвенный колит, болезнь Крона, аутоиммунный гепатит), гематологические заболевания (лимфома, лейкопения, аутоиммунная гемолитическая анемия, идиопатическая тромбоцитопения), ревматологические заболевания (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, полимиозит, васкулит, ревматическая полимиалгия), офтальмологические заболевания (неврит зрительного нерва, увеит, кератоконъюнктивит) и прочие заболевания (рассеянный склероз, нефротический синдром, красный плоский лишай) [47].

В контексте COVID-19 стоит отметить, что глюкокортикоиды обладают противовоспалительным, сосудосуживающим, иммуносупрессивным действием с заметными катаболическими эффектами. Противовоспалительное свойство заключается в индукционном высвобождении противовоспалительных медиаторов и ингибировании высвобождения провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и ИФН- γ) [48]. Иммуносупрессивный эффект опосредован прямым подавлением Т-клеток с блокированием замедленных реакций гиперчувствительности. Благодаря свойству подавления высвобождения гистамина достигается сосудосуживающий эффект глюкокортикоидов [49]. В дополнение стоит отметить данные о противовирусном свойстве глюкокортикоидов, в частности препарата циклесонид.

Циклесонид является безопасным препаратом, широко используемым в качестве ингаляционного гормонального средства для лечения бронхиальной астмы от недоношенных детей и новорождённых до пожилых. По экспериментальным данным циклесонид обладает противовирусной активностью в отношении SARS-CoV-2 и MERS-CoV. Причём стоит отметить специфичное действие циклесонида в отношении коронавирусов. Вероятно, данный глюкокортикоид может действовать совместно с вирусным неструктурным белком Nsp15 для подавления вирусного биогенеза [50]. Противовирусная активность других глюкокортикоидов ещё не доказана.

Глюкокортикоидная терапия является весьма эффективным способом лечения COVID-19. Она снижает риск осложнения COVID-19 в виде острого повреждения лёгких и развития острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). Самым распространёнными глюкокортикоидами при лечении COVID-19 являются дексаметазон и метилпреднизалон [51]. Однако применение глюкокортикоидов при тяжёлой форме ОРДС является спорным.

Дексаметазон (синтетический глюкокортикоид) с 1977 г. включён в Типовой перечень основных лекарственных средств ВОЗ в различных составах и в настоящее время доступен в большинстве стран мира по разумной цене и без патентов [52]. В 2020 г. ВОЗ объявила глюкокортикоиды эффективным средством при лечении COVID-19 и приветствовала результаты испытаний дексаметазона. Невзирая на спорную эффективность дексаметазона против COVID-19, некоторые побочные эффекты были связаны именно с приёмом данного препарата. Есть сообщение, согласно которому, лечение COVID-19 глюкокортикоидами не рекомендуется из-за возможности продления вирусемии и развития сахарного диабета [53].

Длительное применение глюкокортикоидов связано с развитием множества побочных эффектов, включая: остеопороз, остеонекроз, синдром Кушинга, глаукому, катаракту, вторичный сахарный диабет, иммунодефицит, вторичные инфекции и некоторые сердечно-сосудистые заболевания [49]. Пероральный приём глюкокортикоидов был определён как фактор риска развития сердечной недостаточности [54] и острого инфаркта миокарда [55]. Существует большое количество данных о связи глюкокортикоидов с развитием гипертонии, которая, как сообщается, проходит после отмены препарата [56]. Описаны случаи дозозависимого побочного эффекта метилпреднизалона в виде брадикардии [57].

Глюкокортикоиды зачастую использовались бесконтрольно вне зависимости от степени тяжести заболевания COVID-19, и не учитывать потенциальные побочные эффекты опасно для здоровья и жизни пациентов.

Прочие противовирусные средства. Молнупиравир и ритонавир/нирматрелвир — противовирусные препараты группы ингибиторов протеаз. Однако каждый препарат имеет свой механизм воздействия на SARS-CoV-2. Молнупиравир направлен на ингибирование RdRp [58]. Ритонавир/нирматрелвир является ингибитором Mpro [59]. Согласно проведённому метаанализу вышеуказанные препараты эффективны для пациентов с COVID-19 и снижали смертность или госпитализацию примерно на 67% у 2440 наблюдаемых [60]. На момент написания статьи не было найдено ни одного исследования относительно побочных эффектов данных препаратов на сердечно-сосудистую систему. Это можно объяснить относительной новизной препаратов, менее распространённым использованием по всему миру, а также появлением новых, менее опасных штаммов SARS-CoV-2. Однако вернёмся к ранее опи-

санным препаратам. Как мы видим, препарат молнупиравир по своему принципу действия во многом подобен ремдесивиру и фавипиравиру, а вот ритонавир/нирматрелвир, как ни странно это признавать, подобен противовирусному механизму действия фторхинолонам. Про побочные действия на сердечно-сосудистую систему препаратов ремдесивир, фавипиравир, фторхинолонов есть данные. Учитывая схожие механизмы действия препаратов можно сделать вывод — нужно больше исследований с препаратами молнупиравир и паксловид на предмет сердечно-сосудистых осложнений.

Заключение

Врачи должны учитывать кардиотоксичный потенциал всех лекарственных средств, используемых при лечении COVID-19. Следует более детально оценивать сердечно-сосудистые риски при подборе лекарственных средств для лечения COVID-19. Терапевтам и врачам общей практики необходимо больше уделять внимания пациентам, которые получили лечение от COVID-19 при диспансеризации населения.

Дополнительная информация

Источник финансирования. При написании данной статьи авторы не использовали никаких грантов и прочих источников финансирования. Авторы заявляют, что у них нет конкурирующих интересов. Обзор составлен для публичного ознакомления.

Ограничения. Рассматриваемая литература, оценивающая кардиотоксичный потенциал лекарственных средств для лечения COVID-19 не даёт достаточно убедительных данных связи вышеуказанных препаратов с сердечно-сосудистыми заболеваниями в контексте COVID-19. В связи со снижением опасности доминирующих штаммов COVID-19 по всему миру, а также более организованной медицинской помощи населению количество исследований становится меньше. Необходимо больше исследований, особенно независимых.

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

Участие авторов. А. С. Змитрукевич — анализ источников литературы, составление и анализ текста. А. Е. Мамедова — редактирование и анализ текста. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Литература/References

1. Ji W, Wang W, Zhao X. *et al.* Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J Med Virol.* 2020; 92 (4): 433–440. doi: 10.1002/jmv.25682.
2. Zmitrukevich A.S. Cardiovascular changes in COVID19. *Acta Scientific Medical Sciences.* 2022; 6 (Special Issue 2): 32–39. doi: <https://doi.org/10.31080/ASMS.2022.S02.0007>.
3. Elming H., Brendorp B., Køber L. *et al.* QTc interval in the assessment of cardiac risk. *Card Electrophysiol Rev.* 2002; 6 (3): 289–294. doi: 10.1023/A:1016345412555.
4. Romanelli E, Smith K.M., Hoven A.D. Chloroquine and hydroxychloroquine as inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV-1) activity. *Curr Pharmaceutical Des.* 2004; 10 (21): 2643–2648. doi: 10.2174/1381612043383791.
5. Ooi E.E., Chew J.S., Loh J.P., Chua R. *In vitro* inhibition of human influenza A virus replication by chloroquine. *Virology.* 2006; 3 (1): 1–3. doi: 10.1186/1743-422X-3-39.
6. Vincent M.J., Bergeron E., Benjannet S. *et al.* Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology.* 2005; 2 (1): 1–0. doi: 10.1186/1743-422X-2-69.
7. Yao X., Ye F., Zhang M. *et al.* *In vitro* antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis.* 2020; 71 (15): 732–739. doi: 10.1093/cid/ciaa237.
8. Giudicessi J.R., Noseworthy P.A., Friedman P.A., Ackerman M.J. Urgent guidance for navigating and circumventing the QTc-prolonging and torsadogenic potential of possible pharmacotherapies for coronavirus disease 19 (COVID-19). *Mayo Clin Proc.* 2020; 95 (6): 1213–1221. doi: 10.1016/j.mayocp.2020.03.024.
9. Schrezenmeier E., Dörner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nat Rev Rheumatol.* 2020; 16 (3): 155–166. doi: 10.1038/s41584-020-0372-x.
10. Pani A., Lauriola M., Romandini A., Scaglione F. Macrolides and viral infections: focus on azithromycin in COVID-19 pathology. *Int J Antimicrobial Agents.* 2020; 56 (2): 106053. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106053.
11. Tönnemann E., Kandolf R., Lewalter T. Chloroquine cardiomyopathy — a review of the literature. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2013; 35 (3): 434–442. doi: 10.3109/08923973.2013.780078.
12. Radke J.B., Kingery J.M., Maekstad J., Krasowski M.D. Diagnostic pitfalls and laboratory test interference after hydroxychloroquine intoxication: a case report. *Toxicol Rep.* 2019; 6: 1040–1046. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.10.006.
13. Chatre C., Roubille F., Vernhet H. *et al.* Cardiac complications attributed to chloroquine and hydroxychloroquine: a systematic review of the literature. *Drug Saf.* 2018; 41 (10): 919–931. doi: 10.1007/s40264-018-0689-4.
14. Hsia B.C., Greige N., Quiroz J.A. *et al.* QT prolongation in a diverse, urban population of COVID-19 patients treated with hydroxychloroquine, chloroquine, or azithromycin. *J Interv Card Electrophysiol.* 2020; 59 (2): 337–345. doi: 10.1007/s10840-020-00822-x.
15. Gautret P., Lagier J.C., Parola P. *et al.* Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrobial Agents.* 2020; 56 (1): 105949. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105949.
16. Shah R.R. Chloroquine and hydroxychloroquine for COVID-19: Perspectives on their failure in repurposing. *J Clin Pharm Ther.* 2021; 46 (1): 17–27. doi: 10.1111/jcpt.13267.
17. Richter S., Parolin C., Palumbo M., Palù G. Antiviral properties of quinolone-based drugs. *Curr Drug Targets-Infect Dis.* 2004; 4 (2): 111–116. doi: 10.2174/1568005043340920.
18. Cui Q., Cheng H., Xiong R. *et al.* Identification of diaryl-quinoline compounds as entry inhibitors of Ebola virus. *Viruses.* 2018; 10 (12): 678. doi: 10.3390/v10120678.
19. Khan I.A., Siddiqui S., Rehmani S. *et al.* Fluoroquinolones inhibit HCV by targeting its helicase. *Antiviral Ther.* 2012; 17 (3): 467–476. doi: 10.3851/IMP1937.
20. Enoki Y., Ishima Y., Tanaka R. *et al.* Pleiotropic effects of levofloxacin, fluoroquinolone antibiotics, against influenza virus-induced lung injury. *PLoS One.* 2015; 10 (6): e0130248. doi: 10.1371/journal.pone.0130248.
21. Dalhoff A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection.* 2005; 33 (2): 55–70. doi: 10.1007/s15010-005-8209-8.
22. Marciniak K., Beberok A., Peçak P. *et al.* Ciprofloxacin and moxifloxacin could interact with SARS-CoV-2 protease: preliminary *in silico* analysis. *Pharm Rep.* 2020; 72 (6): 1553–1561. doi: 10.1007/s43440-020-00169-0.
23. Karampela I., Dalamaga M. Could respiratory fluoroquinolones, levofloxacin and moxifloxacin, prove to be beneficial as an adjunct treatment in COVID-19? *Arch Med Res.* 2020; 51 (7): 741–742. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.06.004.
24. Falagas M.E., Rafailidis P.I., Rosmarakis E.S. Arrhythmias associated with fluoroquinolone therapy. *International J Antimicrob Agents.* 2007; 29 (4): 374–379. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.11.011.
25. Yu R., Li P. Computational and experimental studies on the inhibitory mechanism of hydroxychloroquine on hERG. *Toxicology.* 2021; 458: 152822. doi: 10.1016/j.tox.2021.152822.
26. Siegel D., Hui H.C., Doerffler E. *et al.* Discovery and synthesis of a phosphoramidate prodrug of a pyrrolo [2, 1-f] [triazin-4-amino] adenine c-nucleoside (GS-5734) for the treatment of ebola and emerging viruses. *J Med Chem.* 2017; 60 (5): 1648–1661. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01594.
27. Choi S.W., Shin J.S., Park S.J. *et al.* Antiviral activity and safety of remdesivir against SARS-CoV-2 infection in human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Antiviral Res.* 2020; 184: 104955. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104955.
28. Mulangu S., Dodd L.E., Davey Jr R.T. *et al.* A randomized, controlled trial of Ebola virus disease therapeutics. *N Eng J Med.* 2019; 381 (24): 2293–2303. doi: 10.1056/NEJMoa1910993.
29. Rau C., Apostolidou S., Singer D. *et al.* Remdesivir, sinus bradycardia and therapeutic drug monitoring in children with severe COVID-19. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2021; 40 (12): e528. doi: 10.1097/INF.0000000000003309.
30. Eleftheriou I., Liaska M., Krepis P. *et al.* Sinus bradycardia in children treated with remdesivir for COVID-19. *Pediatr Infect Dis J.* 2021; 40 (9): e356. doi: 10.1097/INF.0000000000003214.
31. Gupta A.K., Parker B.M., Priyadarshi V., Parker J. Cardiac adverse events with remdesivir in COVID-19 infection. *Cureus.* 2020; 12 (10). doi: 10.7759/cureus.11132.
32. Baranovich T., Wong S.S., Armstrong J. *et al.* T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses *in vitro*. *J Virol.* 2013; 87 (7): 3741–3751. doi: 10.1128/JVI.02346-12.
33. Shannon A., Selisko B., Le N.T. *et al.* Favipiravir strikes the SARS-CoV-2 at its Achilles heel, the RNA polymerase. *BioRxiv.* 2020 May 15. doi: 10.1101/2020.05.15.098731.
34. Руженцова Т.А., Чухлаев П.В., Хавкина Д.А., и др. Эффективность и безопасность применения фавипиравира в комплексной терапии COVID-19 лёгкого и среднетяжёлого течения. *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение.* 2020; 9 (4): 26–38. doi: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-4-26-38>. [Ruzhentsova T.A., Chukhlyayev P.V., Khavkina D.A. Efficacy and safety of favipiravir in mild and moderate COVID-19: results of a randomized trial. *Infectious diseases: News, Opinions, Training.* 2020; 9 (4): 26–38. doi: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-4-26-38>. (in Russian)]
35. Киселёв Ю.Ю., Матвеев А.В., Мирзаев К.Б., Сычёв Д.А. Мониторинг безопасности применения фавипиравира: управление рисками развития нежелательных лекарственных реакций в клинической практике. *Качественная клиническая практика.* 2020; Спецвыпуск S4: 115–119. doi: <https://doi.org/10.37489/2588-0519-2020-S4-115-119>. [Kiselev Yu.Yu., Matveev A.V., Mirzaev K.B., Sychev D.A. Monitoring of safety using favipiravir: risk management of adverse drug reactions in clinical practice. *Kachestvennaya Klinicheskaya Praktika = Good Clinical Practice.* 2020; (4S): 115–119. doi: <https://doi.org/10.37489/2588-0519-2020-S4-115-119>. (in Russian)]
36. Michaud V., Dow P., Al Rihani S.B. *et al.* Risk assessment of drug-induced long QT syndrome for some COVID-19 repurposed drugs. *Clin Transl Sci.* 2021; 14 (1): 20–28. doi: 10.1111/cts.12882.
37. Chinello P., Petrosillo N., Pittalis S. *et al.* QTc interval prolongation during favipiravir therapy in an Ebola virus-infected patient. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11 (12): e0006034. doi: 10.1371/journal.pntd.0006034.
38. Kopecky-Bromberg S.A., Martínez-Sobrido L., Frieman M. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J Virol.* 2007; 81 (2): 548–57. doi: 10.1128/JVI.01782-06.
39. Zhou Q., Chen V., Shannon C.P. *et al.* Interferon-α2b Treatment for COVID-19. *Front Immunol.* 2020; 11: 1061. doi: 10.3389/fimmu.2020.01061.
40. Wang N., Zhan Y., Zhu L. *et al.* Retrospective multicenter cohort study shows early interferon therapy is associated with favorable clinical responses in COVID-19 patients. *Cell Host Microbe.* 2020; 28 (3): 455–464. doi: 10.1016/j.chom.2020.07.005.
41. Логинова С.Я., Щукина В.Н., Савенко С.В., Борисевич С.В. Активность человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2. *Вопросы Вирусологии.* 2021; 66 (2): 123–128. doi: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-13>. [Loginova S.Y., Shchukina V.N., Savenko S.V., Borisevich S.V. *In vitro* activity of human recombinant alpha-2b interferon against SARS-CoV-2 virus. *Problems of Virology.* 2021; 66 (2): 123–128. doi: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-13>. (in Russian)]
42. Li X., Liu T., Hai X., Li L. Interferon-α2b induced anemia in severe coronavirus disease 2019 patients: a single centered, retrospective study.

- Immunopharmacol Immunotoxicol. 2021; 43 (6): 644–650. doi: 10.1080/08923973.2021.1992634.
43. Popescu C., Arama V., Gliga S. Acute pericarditis due to pegylated interferon alpha therapy for chronic HCV hepatitis-case report. BMC Gastroenterol. 2011; 11 (1): 1–4. doi: 10.1186/1471-230X-11-30.
 44. Вершинина С. Ф., Гершанович М. Л., Махнова Е. В., и др. Токсическое действие противоопухолевой терапии на сердечно-сосудистую систему. Вопросы онкологии. 2010; 56 (2): 234–239. [Vershinina S.F., Gershanovich M.L., Makhnova E.V. et al. Toxic effect of antitumor therapy on the cardiovascular system. Voprosy Onkologii. 2010; 56 (2): 234–239. (in Russian)]
 45. Sonnenblick M., Rosin A. Cardiotoxicity of interferon: a review of 44 cases. Chest. 1991; 99 (3): 557–561. doi: 10.1378/chest.99.3.557.
 46. Rechciński T., Matusik D., Rudziński T. et al. Cardiotoxic properties of interferon. Pol Arch Med Wewn. 2007; 117 (1–2): 49–52.
 47. Williams D.M. Clinical pharmacology of corticosteroids. Respir Care. 2018; 63 (6): 655–670. doi: 10.4187/respcare.06314.
 48. Patel S.K., Saikumar G., Rana J. et al. Dexamethasone: A boon for critically ill COVID-19 patients? Travel Med Infect Dis. 2020; 37: 101844. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101844.
 49. Whitehouse M.W. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: reflections after 60 years. Inflammopharmacology. 2011; 19 (1): 1–9. doi: 10.1007/s10787-010-0056-2.
 50. Iwabuchi K., Yoshie K., Kurakami Y. et al. Therapeutic potential of ciclesonide inhalation for COVID-19 pneumonia: report of three cases. J Infect Chemother. 2020; 26 (6): 625–632. doi: 10.1016/j.jiac.2020.04.007.
 51. El-Saber Batiha G., Al-Gareeb A.I., Saad H.M., Al-Kuraishi H.M. COVID-19 and corticosteroids: a narrative review. Inflammopharmacology. 2022; 30 (4): 1189–1205. doi: 10.1007/s10787-022-00987-z.
 52. Broccoli M.C., Pigoga J.L., Nyirenda M. et al. Essential medicines for emergency care in Africa. Afr J Emerg Med. 2018; 8 (3): 110–117. doi: 10.1016/j.afjem.2018.05.002.
 53. Russell C.D., Millar J.E., Baillie J.K. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. Lancet. 2020; 395 (10223): 473–475. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30317-2.
 54. Souverein P.C., Berard A., Van Staa T.P. et al. Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. Heart. 2004; 90 (8): 859–865. doi: 10.1136/hrt.2003.020180.
 55. Varas-Lorenzo C., Rodriguez L.A., Maguire A. et al. Use of oral corticosteroids and the risk of acute myocardial infarction. Atherosclerosis. 2007; 192 (2): 376–383. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.019.
 56. Sanders B.P., Portman R.J., Ramey R.A. et al. Hypertension during reduction of long-term steroid therapy in young subjects with asthma. J Allergy Clin Immunol. 1992; 89 (4): 816–821. doi: 10.1016/0091-6749(92)90436-6.
 57. Üsküdar Cansu D., Bodakçi E., Korkmaz C. Dose-dependent bradycardia as a rare side effect of corticosteroids: a case report and review of the literature. Rheumatol Int. 2018; 38 (12): 2337–2343. doi: 10.1007/s00296-018-4167-1.
 58. Kabinger F., Stiller C., Schmitzová J. et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. Nature Structural & Molecular Biology. 2021; 28 (9): 740–746. doi: 10.1038/s41594-021-00651-0.
 59. Mahase E. COVID-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. BMJ. 2021; 375: n2713. doi: 10.1136/bmj.n2713.
 60. Wen W., Chen C., Tang J. et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19: a meta-analysis. Ann Med. 2022; 54 (1): 516–523. doi: 10.1080/07853890.2022.2034936.

Информация об авторах

Змитрукевич Андрей Станиславович — врач общей практики, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 11 Департамента здравоохранения города Москвы»; ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней ЛФ, ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6665-8601. eLibrary SPIN: 9865-1760

Мамедова Анастасия Евгеньевна – ассистент кафедры Биологической химии, Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь. ORCID ID: 0000-0001-9183-3216. eLibrary SPIN: 7525-6743

About the authors

Andrei S. Zmitrukevich — General practitioner, City Clinic No. 11 of the Moscow Healthcare Department; Assistant of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases of the Faculty of General Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6665-8601. eLibrary SPIN: 9865-1760

Anastasiya E. Mamedova — Assistant at the Department of Biological Chemistry, Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus. ORCID ID: 0000-0001-9183-3216. eLibrary SPIN: 7525-6743

Устойчивость к противомикробным препаратам при инфекциях, передаваемых половым путем: современные тенденции

А. А. ХРЯНИН

Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

Antimicrobial Resistance in Sexually Transmitted Infections: Current Trends

ALEKSEY A. KHRYANIN

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Резюме

В обзоре обсуждаются современные тенденции антибиотикорезистентности при бактериальных и протозойных инфекциях, передаваемых половым путем (ИППП). Устойчивость к противомикробным препаратам при ИППП в последние десятилетия значительно увеличилась из-за чрезмерного и неправильного использования антибиотиков, чему способствуют миграция населения и высокая заболеваемость ИППП в мире. В то время как появившиеся штаммы *Neisseria gonorrhoeae*, резистентные к цефалоспорином, являются одной из наиболее важных проблем в мире, всё чаще регистрируются и другие патогенные ИППП, устойчивые к антибиотикам, например, *Mycoplasma genitalium* и *Chlamydia trachomatis*. Среди исследователей вызывает особую тревогу появление мультирезистентных штаммов бактериальных ИППП. Возникший глобальный кризис в лечении — это итог пренебрежения и невнимания к неоднократным предупреждениям исследователей о появлении резистентных штаммов ИППП к имеющимся антибиотикам и смещению приоритетов фармацевтической промышленности, в результате чего новые разработки антибиотиков были практически полностью утрачены. Текущий портфель противомикробных препаратов не даёт повода для оптимизма, поскольку содержит мало новых антибиотиков, а большинство разработок находятся на ранних стадиях клинических испытаний. Эксперты предположили, что неудачи существующих схем лечения ИППП в значительной степени неизбежны и призвали к созданию совершенно новых классов противомикробных препаратов, для появления которых потребуется не одно десятилетие. В настоящее время имеется несколько многообещающих альтернативных стратегий лечения устойчивых к антибиотикам ИППП, в частности, перспективными направлениями являются применение фаговой терапии, антимикробных пептидов и гидролитических ферментов.

Ключевые слова: инфекции, передаваемые половым путем; *Neisseria gonorrhoeae*; *Mycoplasma genitalium*; *Chlamydia trachomatis*; *Trichomonas vaginalis*; *Treponema pallidum*; антибиотик; резистентность

Для цитирования: Хрянин А. А. Устойчивость к противомикробным препаратам при инфекциях, передаваемых половым путем: современные тенденции. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68 (9–10): 93–101. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-93-101>.

Abstract

The review article discusses current trends in antibiotic resistance in bacterial and protozoal sexually transmitted infections (STIs). Antimicrobial resistance in STIs has increased significantly in recent decades due to the overuse and misuse of antibiotics, fueled by population migration and the high incidence of STIs worldwide. While emerging cephalosporin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* are one of the most pressing problems in the world, other pathogenic STIs that are resistant to antibiotics, such as *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis*, are increasingly being reported. The emergence of multidrug-resistant strains of bacterial STIs is of particular concern for researchers. The emerging global crisis in STI treatment is the result of neglect and inattention to repeated warnings from researchers about the emergence of STI strains resistant to the existing antibiotics, as well as shifting priorities in the pharmaceutical industry, which limited the development of new antibiotics. The current antimicrobial portfolio does not provide cause for optimism, as it contains few new antibiotics, and most developments are in the early stages of clinical trials. Experts have suggested that the failure of existing STI treatment regimens is largely inevitable and have called for the creation of entirely new classes of antimicrobial drugs that would take decades to develop. Currently, there are several promising alternative strategies for the treatment of antibiotic-resistant STIs. The use of phage therapy, antimicrobial peptides, and hydrolytic enzymes are particularly promising directions.

Keywords: sexually transmitted infections; *Neisseria gonorrhoea*; *Mycoplasma genitalium*; *Chlamydia trachomatis*; *Trichomonas vaginalis*; *Treponema pallidum*; antibiotic; resistance

For citation: Khryanin A. A. Antimicrobial resistance in sexually transmitted infections: current trends. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68 (9–10): 93–101. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-93-101>.

© А. А. Хрянин, 2023

*Адрес для корреспонденции: Красный пр-кт, д. 52, Новосибирский ГМУ, г. Новосибирск, Россия, 630091.
E-mail: khryanin@mail.ru

© А. А. Khryanin, 2023

*Correspondence to: 52 Krasniy Prospect, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 630091 Russia.
E-mail: khryanin@mail.ru

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежедневно около 1 млн человек заражаются любой из четырёх излечимых инфекций, передаваемых половым путём (ИППП): хламидийная, гонококковая, сифилитическая и трихомонадная инфекции [1–7]. Хотя устойчивость к противомикробным препаратам при ИППП известна достаточно давно, появление мультирезистентных (устойчивых к трём антибиотикам) и экстрарезистентных (устойчивых к четырём и более лекарственным препаратам) штаммов — относительно недавнее явление. Например, об устойчивости *Neisseria gonorrhoea* к тетрациклину впервые исследователи сообщили в 1980-х гг., а об устойчивости возбудителя к ципрофлоксацину — уже в начале 2000-х гг. [8–10].

По официальным данным Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC), среди 334 826 зарегистрированных случаев *N.gonorrhoea* в Соединённых Штатах Америки в 2012 г. были устойчивы к пенициллину, тетрациклину, ципрофлоксацину или их комбинации 33,4% отобранных изолятов. Кроме того, 1% штаммов *N.gonorrhoea* были устойчивы к цефиксиму, 14,7% — к ципрофлоксацину и 0,3% — к азитромицину [8–10].

В последнее время во всём мире отмечается растущая устойчивость к противомикробным препаратам при бактериальных и протозойных ИППП: *Neisseria gonorrhoea*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* и *Mycoplasma genitalium* [11–16]. Распространённость бактериальных и протозойных ИППП с лекарственной устойчивостью значительно отличается в разных регионах мира, но наиболее высокие уровни резистентности к противомикробным препаратам выявлены в странах с низким и средним уровнем дохода населения [17–21].

Причины возникновения антибиотикорезистентности достаточно сложны и, как правило, включают низкое качество медицинских услуг, высокое бремя инфекционных заболеваний, меньший контроль со стороны регулирующих органов, несоответствующую дозировку и использование противомикробных препаратов, а также низкий уровень знаний о рисках микробной резистентности. В частности, антибиотикопрофилактика при различных операционных осложнениях как в гинекологической, так и в урологической практике не должна включать антибиотики с максимально широким спектром действия, которые используются для лечения этих заболеваний. Антибиотики, применяемые для профилактики должны иметь узкий спектр активности, достаточный для охвата основных, но не всех вероятных возбудителей послеоперационных осложнений, при этом длительность антибиотикопрофилактики должна быть максимально короткой [22].

Важно отметить, что промышленно развитые страны также вносят значительный вклад в растущую лекарственную устойчивость, широко используя антибиотики в животноводстве и агрономии [8].

Устойчивость к антибиотикам возникла за последние несколько десятилетий, но за это время было разработано совсем немного новых противомикробных препаратов. Между 1930 г. и 1962 г. фармацевтическая промышленность представила 20 новых классов антибиотиков. С тех пор к противомикробному арсеналу были добавлены только четыре новых класса лекарственных средств, и большинство новых антибиотиков являются производными уже существующих лекарственных средств. Многие из них утратили эффективность, поскольку у бактерий развилась перекрёстная устойчивость к целым классам антибиотиков. Из 13 антибиотиков, одобренных Федеральным управлением по лекарственным средствам с 2004 г., ни один из них не был разрешён для лечения ИППП. Согласно анализу Независимого института, от подачи заявки до утверждения её Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) обычно проходит около 7–13 лет. Среди поданных заявок только около 8% доходят до фармацевтического рынка. Последние противомикробные препараты, которые нашли широкое применение при ИППП, появились на фармацевтическом рынке в 1993 г. [8].

Рассмотрим наиболее важные и распространённые бактериальные и протозойные ИППП, которые обладают в разной степени устойчивостью к противомикробным препаратам.

Инфекции, вызванные *Neisseria gonorrhoeae*

Гонококковая инфекция и её устойчивость к противомикробным препаратам являются серьёзной глобальной проблемой здравоохранения. Согласно последним официальным данным ВОЗ, около 86,9 млн взрослых ежегодно инфицируются *N.gonorrhoea* во всём мире [1, 23]. Наибольшее число случаев заболевания гонококковой инфекцией в 2020 г. было зарегистрировано среди взрослого населения в Западной части Тихого океана (23,4 млн) и в Африканском регионе (21,8 миллиона) [1]. Осложнения *N.gonorrhoeae* несоразмерно чаще возникают у женщин и включают воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), внематочную беременность, бесплодие и увеличение риска инфицирования ВИЧ [1–8]. Патогенный микроорганизм демонстрирует высокую способность сопротивляться антибиотикам; у него развилась устойчивость к сульфониламидам в 1940-х гг., к пенициллину в

конце 1970-х гг. и к фторхинолонам в 1990-х гг. Совсем недавно были обнаружены штаммы *N.gonorrhoea*, устойчивые к тетрациклину в различных регионах мира. Больше всего исследователей беспокоит тот факт, что в настоящее время регистрируется резистентность к последнему классу фармацевтических препаратов, пригодных для монотерапии *N.gonorrhoeae* — цефалоспоринов расширенного спектра действия [24–27]. Существует несколько альтернативных вариантов лечения инфекций, вызванных *N.gonorrhoea*, включая использование спектиномицина, гентамицина и азитромицина, хотя каждый из них имеет недостатки, включая ограниченную био-

доступность в некоторых анатомических участках (орофаренгиальная и ректальная локализация гонококковой инфекции) [28–30].

Таким образом, гонококковая инфекция трудно поддается лечению и может стать неизлечимой из-за высокого уровня устойчивости к противомикробным препаратам во всем мире (таблица) [1].

В 2017–2018 гг. изоляты *N.gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью или устойчивостью к цефтриаксону были зарегистрированы в 21 из 68 стран, представивших отчетность (31% по сравнению с 24% в 2015–2016 гг.), а к цефиксиму — в 24 из 51 страны, представившей отчетность (47%

Количество стран-членов ВОЗ, сообщивших об изолятах *Neisseria gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью или устойчивостью к цефтриаксону и цефиксиму, а также резистентностью к азитромицину и ципрофлоксацину в 2017–2018 гг. [1]

Number of WHO Member States reporting *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility or resistance to ceftriaxone and cefixime, and resistance to azithromycin and ciprofloxacin in 2017–2018 [1]

Показатель	Африка (n=47)	Америка (n=35)	Восточное Средиземно- море (n=21)	Европа (n=53)	Юго-Восточная Азия (n=11)	Западная часть Тихого океана (n=27)	Всего (n=194)
Цефтриаксон*							
Отчётность стран	5 (11%)	9 (26%)	7 (33%)	30 (57%)	4 (36%)	13 (48%)	68 (35%)
≥5% снижение чувствительности и резистентности**	0	0	1 (14%)	0	0	5 (38%)	6 (9%)
<5% снижение чувствительности и резистентности	2 (40%)	2 (22%)	1 (14%)	3 (10%)	2 (50%)	5 (38%)	15 (22%)
Чувствительность	3 (60%)	7 (78%)	5 (71%)	27 (90%)	2 (50%)	3 (23%)	47 (69%)
Цефиксим*							
Отчётность стран	4 (9%)	13 (37%)	3 (14%)	30 (57%)	0	1 (4%)	51 (26%)
≥5% снижение чувствительности и резистентности**	0	0	1 (33%)	8 (27%)	0	0	9 (18%)
<5% снижение чувствительности и резистентности	1 (25%)	2 (15%)	0	11 (37%)	0	1 (100%)	15 (29%)
Чувствительность	3 (75%)	11 (85%)	2 (67%)	11 (37%)	0	0	27 (53%)
Азитромицин							
Отчётность стран	5 (11%)	9 (26%)	3 (14%)	30 (57%)	4 (36%)	10 (37%)	61 (31%)
≥5% резистентность**	2 (40%)	8 (89%)	2 (67%)	25 (83%)	1 (25%)	6 (60%)	44 (72%)
<5% резистентность	2 (40%)	1 (11%)	0	0	2 (50%)	2 (20%)	7 (11%)
Чувствительность	1 (20%)	0	1 (33%)	5 (17%)	1 (25%)	2 (20%)	10 (16%)
Ципрофлоксацин							
Отчётность стран	4 (9%)	13 (37%)	7 (33%)	30 (57%)	4 (36%)	12 (44%)	70 (36%)
>90% резистентность***	2 (50%)	3 (23%)	3 (43%)	0	4 (100%)	4 (33%)	16 (23%)
≥5% резистентность**	2 (50%)	10 (77%)	4 (57%)	30 (100%)	0	8 (67%)	54 (77%)
<5% резистентность	0	0	0	0	0	0	0
Чувствительность	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. * Снижение чувствительности и резистентности были объединены для цефтриаксона и цефиксима из-за различных методов тестирования устойчивости к противомикробным препаратам. ** Уровень резистентности, при котором ВОЗ рекомендует прекратить эмпирическую противомикробную терапию первой линии при монотерапии гонококковой инфекции. *** Произвольный уровень резистентности, демонстрирующий чрезвычайно высокий уровень устойчивости к ципрофлоксацину.

Note. *Reduced susceptibility and resistance were combined for ceftriaxone and cefixime due to different antimicrobial resistance testing methods. ** Level of resistance at which WHO recommends discontinuation of empirical first-line antimicrobial therapy for gonococcal monotherapy. ***Arbitrary level of resistance, demonstrating extremely high levels of resistance to ciprofloxacin.

по сравнению с 45% в 2015–2016 гг.). Об изолятах *N.gonorrhoeae* с устойчивостью к азитромицину сообщила 51 из 61 страны, представившей отчетность (84%; рост с 81% в 2015–2016 гг.), а к ципрофлоксацину — все 70 стран, представивших отчетность (100%; также 100% в 2015–2016 гг.) [1, 7].

В течение 2017–2018 гг. ежегодная доля снижения чувствительности или резистентности в 51–70 странах варьировала от 0 до 21% к цефтриаксону и от 0 до 22% — к цефиксиму, а доля устойчивости менялась от 0 до 60% к азитромицину и от 0 до 100% — к ципрофлоксацину [1, 7].

В 2018 г. по данным отчета ВОЗ, 62 страны представили данные об устойчивости к цефтриаксону. В целом, 17 (27%) из этих 62 стран сообщили об изолятах *N.gonorrhoeae* со сниженной чувствительностью или устойчивостью к цефтриаксону, что больше на 22% по сравнению с 2016 г. [1, 7].

Проведённые отечественные исследования установили достаточно низкую долю российских клинических изолятов *N.gonorrhoeae*, проявляющих устойчивость к азитромицину: 2,3% — в 2007 г. и 0,4% — в 2008 г. Однако в последующие годы антибиотикорезистентность к азитромицину стала неуклонно возрастать с достижением максимума в 2011 г., когда устойчивость к данному антибиотику была выявлена у 17,0% исследованных клинических изолятов *N.gonorrhoeae* в России [31].

В некоторых странах вернулись к монотерапии цефтриаксоном в качестве рекомендуемой терапии первой линии, например, в Великобритании (монотерапия 1 г) и США (монотерапия 500 мг). Кроме того, в Европейском руководстве по лечению гонококковой инфекции (2020) рекомендуется монотерапия цефтриаксоном 1 г в качестве варианта лечения ректальной гонококковой инфекции (при отсутствии резистентности к цефтриаксону) [1].

Сифилитическая инфекция

Сифилис (*Lues*) — системное инфекционное заболевание с последовательной сменой клинических стадий, вызываемое бактериями вида *Treponema pallidum*. Сифилис является актуальной проблемой здравоохранения во всём мире. Несмотря на принимаемые профилактические меры, сифилитическая инфекция, остаётся причиной серьёзных нарушений здоровья у пациентов, вплоть до стойкой инвалидизации и летальных исходов. В последние годы в России отмечается тенденция к увеличению количества латентных и поздних форм, в том числе кардиоваскулярного сифилиса и нейросифилиса [32–34]. По данным ВОЗ, в 2008 г. зарегистрировано 10,6 млн новых случаев сифилиса, большинство из которых выявлено в развивающихся странах [8, 23].

Сообщения об устойчивости к макролидам, основной альтернативе пенициллину для лечения *T.pallidum* появились в 1960-х гг. M. South и соавт. [35], а также L. Fenton и I. Light [36] сообщили о неэффективности лечения сифилиса с помощью эритромицина ещё в 1964 г. Хотя в настоящее время существуют опасения, что у *T.pallidum* может развиться устойчивость к тетрациклинам и их производным, пока отсутствуют доказательства того, что это действительно происходит [37, 38]. Официально зарегистрированных случаев резистентности *T.pallidum* к пенициллину не выявлено.

Отечественные исследования по изучению макролидорезистентности у *T.pallidum* немногочисленны. В целом в 2018–2019 гг. устойчивость к макролидам выявлена у 7,81% современных российских клинических изолятов *T.pallidum*, что превышает установленный ВОЗ пороговый уровень, позволяющий рекомендовать лекарственное средство для терапии ИППП [39].

Инфекции, вызванные *Trichomonas vaginalis*

Урогенитальный трихомониаз вызывается простейшим паразитом *Trichomonas vaginalis*, впервые обнаруженным в 1836 г. французским бактериологом и врачом Alfred Donne [8]. Ежегодная заболеваемость трихомониазом в мире составляет около 250 млн случаев и является очередной глобальной проблемой здравоохранения [8]. Трихомонадная инфекция — наиболее распространённая невирусная ИППП в мире [23]. В течение последних 40 лет метронидазол оставался «золотым стандартом» лечения трихомониаза. Однако в последнее время появляются данные о широком распространении *T.vaginalis*, резистентных к метронидазолу. Это вызвало серьёзную обеспокоенность среди экспертов по ИППП и специалистов здравоохранения, поскольку *T.vaginalis* связана с повышенным риском заражения ВИЧ-1, неблагоприятными исходами беременности и ВЗОМТ. Исследование, проведённое в США, установило, что 4,3% изолятов *T.vaginalis* проявляют низкий уровень устойчивости к метронидазолу. Самые высокие уровни резистентности к метронидазолу в США установлены в Денвере (7,5%), Сиэтле (5,8%) и Сан-Франциско (4,9%) [13]. Резистентные к метронидазолу трихомонады выявлены в Финляндии [40], Иране [41], Испании [42] и Папуа-Новой Гвинее [43]. Кроме того, исследование образцов, отправленных в Центры по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) из Великобритании, Южной Африки, Австралии и Индии, также свидетельствуют об устойчивости *T.vaginalis* к метронидазолу от низкой до высокой [44]. К сожалению, общепринятых клинических руководств по лечению рези-

стентной к метронидазолу трихомонадной инфекции не существует, что вызывает тревогу и разочарование у практикующих врачей. Несмотря на то, что предложены различные терапевтические схемы лечения трихомониаза, нет единого мнения экспертов о терапии трихомонадной инфекции, резистентной к метронидазолу [19].

Инфекции, вызванные *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis является наиболее распространённой из бактериальных ИППП и вызывает развитие таких осложнений, как ВЗОМТ, внематочная беременность и трубное бесплодие. По официальным данным ВОЗ, ежегодно регистрируется 105,7 млн новых случаев урогенитальной хламидийной инфекции среди сексуально активного населения в мире [8, 23]. В настоящее время имеется мало данных о распространённости штаммов *C. trachomatis*, устойчивых к тетрациклам, макролидам и фторхинолонам. Увеличивается количество сообщений о повторных случаях выявления хламидийной инфекции после проведённого антибактериального лечения [45]. До недавнего времени предполагалось, что неудачи в лечении были результатом повторного заражения, но теперь это ставится под сомнение, по мнению некоторых авторов [12, 45]. Несколько научных исследований подтвердили неэффективность лечения азитромицином как у женщин, так и у мужчин с выявленной хламидийной инфекцией, которые не подвергались риску повторного заражения *C. trachomatis* [46, 47].

Следует отметить, что стандартным биомаркером для установления различных штаммов при повторных инфекциях, вызванных *C. trachomatis*, является изучение их серотипа или генотипа, определяемого на основном белке наружной мембраны хламидий (MOMP) или гене *ompA*. Высказано предположение, что повторное заражение одним и тем же штаммом *C. trachomatis* при отсутствии полового контакта более вероятно из-за неэффективности проведённого антибактериального лечения вследствие возникшей устойчивости к антибиотикам [45–47]. В нескольких исследованиях выявлены изоляты *C. trachomatis*, которые оказались устойчивыми к одному или нескольким антибактериальным препаратам, включая доксициклин, азитромицин, офлоксацин, тетрациклин, эритромицин, сульфаметоксазол и клиндамицин [48, 49]. Распространённость таких штаммов пока неизвестна, но учитывая высокую заболеваемость урогенитальной хламидийной инфекцией среди взрослого населения в мире, существует необходимость в дополнительных исследованиях механизмов устойчивости *C. trachomatis* к противомикробным препаратам.

Кроме того, S. Filardo и соавт. [50] проанализировали взаимодействие между *Gardnerella* spp. и *C. trachomatis* и предположили, что бактериальные биоплёнки могут служить резервуаром для хламидий и таким образом, способствовать их передаче и распространению в верхние отделы урогенитального тракта, повышая риск развития тяжёлых репродуктивных осложнений (ВЗОМТ) [50, 51].

Тесная взаимосвязь между *G. vaginalis* и *C. trachomatis* подчёркивает важность нормальной вагинальной микробиоты в защите от заражения облигатными патогенными ИППП. Следует также отметить, что широкий спектр патогенов, ассоциированных с бактериальным вагинозом, влияет на эпителиальный гомеостаз за счёт снижения вязкости цервика-вагинальной жидкости из-за продукции ферментов, разрушающих муцин [52]. Такие ферменты, как сиалидазы, α -фукозидаза, α - и β -галактозидаза, N-ацетил-глюкозаминидаза, глицин- и аргинин-аминопептидазы, участвуют в деградации слизистого слоя, покрывающего эпителий шейки матки, вызывая микротравмы или изменения эпителиальных клеток [53, 54]. Следовательно, указанные ферменты могут способствовать вирулентности за счёт разрушения защитного барьера слизистой оболочки и, следовательно, повышать восприимчивость к инфицированию *C. trachomatis* и *N. gonorrhoeae* [55, 56].

Таким образом, возбудители ИППП, в частности *C. trachomatis*, могут входить в состав полимикробной биоплёнки и увеличивать риск репродуктивных осложнений у женщин и мужчин. Такое межвидовое сотрудничество бактерий может иметь серьёзные клинические последствия, способствуя медленно прогрессирующему хроническому течению инфекции, торпидной к антибактериальным препаратам.

Инфекции, вызванные *Mycoplasma genitalium*

Mycoplasma genitalium, открытая сравнительно недавно (1981 г.), признана облигатной патогенной ИППП. *M. genitalium* вызывает острый и хронический негонеомокковый уретрит у мужчин, при этом появляется всё больше данных, свидетельствующих о том, что этот возбудитель вызывает цервицит и ВЗОМТ у женщин [8, 15, 16]. Роль этой инфекции в ряде других клинических синдромов пока не ясна. У большинства инфицированных людей *M. genitalium* клинические симптомы отсутствуют. Только с появлением лабораторных методов выявления этой инфекции, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), возрос интерес к попыткам понять эффективность различных методов лечения, а также к исследованиям лекарственной чувствительности *M. genitalium* [57]. Ограниченная доступность диагностических воз-

возможностей выявления этой инфекции способствовала синдромальному лечению пациентов, что привело к широко распространённой устойчивости *M.genitalium* к противомикробным препаратам. Учитывая, что только несколько классов противомикробных препаратов обладают активностью против *M.genitalium*, в настоящее время существует серьёзная озабоченность исследователей по поводу появления мультирезистентных штаммов ко всем имеющимся антибиотиками [8, 15, 16].

Устойчивость *M.genitalium* к противомикробным препаратам может возникать в результате избирательного воздействия антибиотиков на организм, что приводит к мутационным изменениям во время лечения, или путём отбора уже существующих ранее мутаций. Учитывая трудности с тестированием фенотипической чувствительности, генотипическое тестирование для выявления мутаций, связанных с устойчивостью, чаще всего используется для прогнозирования устойчивости к противомикробным препаратам у *M.genitalium* [57].

Появляется всё больше доказательств того, что использование тетрациклинов приводит к высокой частоте неэффективности лечения, поэтому текущие стратегии сосредоточены на использовании макролидов, таких как азитромицин; и фторхинолонов, таких как моксифлоксацин. Для ципрофлоксацина, левофлоксацина и офлоксацина характерно снижение эффективности лечения инфекции, вызванной *M.genitalium* [57].

Недавние исследования показали тревожный рост *M.genitalium* с генотипическими маркерами устойчивости к макролидам и фторхинолонам среди мужчин с негонококковым уретритом. Кроме того, в Австралии были выявлены устойчивые к моксифлоксацину бактерии [58], а другое исследование установило, что около 60% *M.genitalium* были устойчивы к азитромицину, при этом 90–100% мужчин, получавших этот антибиотик, столкнулись с неэффективностью лечения [59]. В целом, макролидорезистентность *M.genitalium* является крайне актуальной проблемой, при этом уровень резистентности к макролидам в настоящее время оценивается в 30–100% во всём мире [60].

Отечественные исследования по изучению макролидорезистентности у *M.genitalium*, а также определению спектра и распространённости маркеров устойчивости до сих пор немногочисленны. По данным опубликованных российских исследований, частота встречаемости мутаций, ассоциированных с устойчивостью к макролидам у *M.genitalium*, в Москве, Смоленске и Туле не превышает 6% [61].

Таким образом, в настоящее время мультирезистентность *M.genitalium* к макролидам и фторхинолонам увеличивается во всём мире, что вызывает серьёзную обеспокоенность у экспертов, учитывая ограниченность доступных аль-

тернативных вариантов лечения. Зарубежные руководства рекомендуют моксифлоксацин в качестве терапии второй линии при инфекции *M.genitalium* [60, 62, 63].

Альтернативные стратегии лечения патогенов, устойчивых к антибиотикам

Поиск альтернатив антибиотикам становится необходимостью для глобального здравоохранения. В настоящее время исследователи изучают несколько нетрадиционных подходов к лечению инфекций, устойчивых к антибиотикам, к ним относятся: бактериофаговая терапия, противомикробные пептиды, гидролитические ферменты, фитохимические препараты, металлоантибиотики, ингибиторы эффлюксной помпы и различные другие стратегии вмешательства в биосинтез белков, необходимые для бактериального метаболизма и размножения. Кратко остановимся на некоторых из вышеперечисленных альтернативных стратегий лечения бактериальных патогенов, устойчивых к антибиотикам.

Фаговая терапия. Бактериофаги или вирусы, атакующие и заражающие бактерии, используются в медицине уже почти столетие. Создатель фаготерапии, французско-канадский микробиолог F. d'Herelle первым осознал их потенциал в лечении бактериальных инфекций. Начиная с 1917 г. он использовал бактериофаг для лечения широкого спектра патогенных инфекций, включая *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, виды *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Neisseria meningitis* [8].

В то время как фаговая терапия была чрезвычайно популярна в 1920-х гг. и 1930-х гг., интерес к их использованию угас после появления антибиотиков. Несмотря на то, что фаговая терапия была забыта в большинстве стран мира; Россия, Польша и Грузия продолжают использовать их как в научных исследованиях, так и в лечении различных заболеваний. Современные исследования сосредоточены на использовании бактериофагов для доставки антимикробных агентов в очаги инфекции, в качестве адъювантов для бактерицидных антибиотиков и для лечения устойчивых к противомикробным препаратам бактериальных микроорганизмов. В то время как большая часть научных работ была сосредоточена на устойчивых к антибиотикам внутрибольничных инфекциях, несколько исследовательских групп изучают использование фагов для лечения ИППП.

S. R. Bhattarai и соавт. [64] из Калифорнийского университета продемонстрировали использование сконструированных фагов для ингибирования внутриклеточной инфекции *C.trachomatis* [64].

М. А. Lovett [65] разработал векторы бактериофагов, содержащие рекомбинантные ДНК-производные антигены *T.pallidum* для размножения в *E.coli*, потенциальный иммунизирующий агент против возбудителя сифилиса. А. Piekarowicz и соавт. [66] провели биоинформатический анализ последовательности генома *N.gonorrhoeae*, идентифицировав островки профагов, которые кодируют функционально активные фаги.

Антимикробные пептиды. Растущее количество исследований продемонстрировало важность антимикробных пептидов (АМР) как части врождённой иммунной системы всех живых организмов. За последние несколько десятилетий появился интерес к использованию этих эффекторных молекул, обнаруженных в бактериях, растениях и животных, в качестве противомикробных препаратов. Бактерицидное действие большинства АМР включает разрушение бактериальных мембран и связывание с внутриклеточными молекулами для ингибирования биосинтеза клеточной стенки и синтеза ДНК, РНК и белка. Хотя научные исследования всё ещё являются предварительными, некоторые из них являются многообещающими в лечении ИППП. Так, А. Zairi и соавт. [67] продемонстрировали антигонококковые эффекты с использованием синтетических пептидов, полученных из природного дермасептина S4 АМР. Исследования показали, что АМР LL-37 обладал широким спектром активности против ряда патогенных бактерий, включая *T.pallidum*, а протегрин АМР, обнаруженный в лейкоцитах свиньи, обладал бактерицидным действием против *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis* и даже ВИЧ-инфекции [67].

Гидролитические ферменты. Установлена способность комплекса гидролитических энзимов, входящих в состав системной энзимотерапии, уменьшать количество внеклеточного матрикса в бактериальных биоплёнках, что способствовало снижению эффективности передачи генов (в т. ч. плазмид резистентности) между бактериями биоплёнок. Установлено статистически значимое снижение частоты передачи плазмидных генов антибиотикоустойчивости в бактериальных биоплёнках использованных штаммов (*E.coli* HB101, tetR, имеющие хромосомный ген устойчивости к

тетрациклину и *E.coli* DH5 alfa, рuc 19 ampR, несущие ген устойчивости к ампициллину) [68]. Эти данные служат объяснением известной и доказанной в клинических исследованиях способности препаратов системной энзимотерапии повышать эффективность антибактериальной терапии при ИППП [22, 68].

Заключение

Как отметили А. Fauci и L. Marston [69], устойчивость к противомикробным препаратам — это постоянная проблема, упорная борьба за господство. Устойчивость к антибиотикам, как естественное следствие эволюционного отбора, в последние десятилетия ускорилась из-за чрезмерного и неправильного использования антибиотиков, чему способствуют миграция населения и высокий уровень заболеваемости ИППП. Выявление штаммов гонококковой инфекции с мультирезистентностью и их широкой распространённостью в мире создаёт предпосылки для изучения и поиска новых стратегий лечения устойчивости к антибиотикам. В настоящее время имеется несколько альтернатив, но даже фаговая терапия сталкивается со значительными препятствиями из-за исторической предвзятости в западном мире и отсутствия необходимой инфраструктуры.

Эксперты ВОЗ в разделе приоритетных направлений в области ИППП делают акцент на проблеме выявления устойчивости к антимикробным препаратам, оценке состояния вопроса на уровне стран и создании платформ для регулярного эпидемиологического мониторинга за распространением устойчивых патогенов [70].

По мере роста устойчивости к противомикробным препаратам в глобальном масштабе необходимо адаптировать методы лечения ИППП, чтобы более 95% клинических инфекций реагировали на схемы лечения первой линии в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Этого можно достичь только путём определения фенотипов или генотипов чувствительности к антибиотикам этих патогенов в рамках национальных и региональных мероприятий по эпидемиологическому надзору. Однако в большинстве стран мира такая деятельность, к сожалению, недостаточна или отсутствует.

Литература/References

- Unemo M., Lahra M.M., Escher M. et al. WHO global antimicrobial resistance surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* 2017–18: a retrospective observational study. *Lancet Microbe* 2021; 2: e627–636. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00171-3.
- Rowley J., Vander Hoorn S., Korenromp E. et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ.* 2019; 97: 548–562. doi: 10.2471/BLT.18.228486.
- WHO. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>.
- Wi T., Lahra M.M., Ndowa F. et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: global surveillance and a call for international collaborative action. *PLoS Med.* 2017; 14:e1002344. doi: 10.1371/journal.pmed.1002344.
- Sena A.C., Bachmann L., Johnston C. et al. Optimising treatments for sexually transmitted infections: surveillance, pharmacokinetics and pharmacodynamics, therapeutic strategies, and molecular resistance prediction. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20: e181–e191. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30171-7.
- Unemo M., Bradshaw C.S., Hocking J.S. et al. Sexually transmitted infections: challenges ahead. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17: e235–e279. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30310-9.

7. Unemo M., Lahra M.M., Cole M. et al. World Health Organization Global Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program (WHO GASP): review of new data and evidence to inform international collaborative actions and research efforts. *Sex Health*. 2019; 16: 412–425. doi: 10.1071/SH19023.
8. Krupp K., Madhivanan P. Antibiotic resistance in prevalent bacterial and protozoan sexually transmitted infections. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2015 Jan-Jun; 36 (1): 3–8. doi: 10.4103/2589-0557.156680.
9. Centers for Disease Control (CDC). Tetracycline-resistant *Neisseria gonorrhoeae* — Georgia, Pennsylvania, New Hampshire. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1985; 34: 563.
10. Llanes R., Sosa J., Guzmán D. et al. *Neisseria gonorrhoeae* resistant to ciprofloxacin: first report in Cuba. *Sex Transm Dis*. 2001; 28 (2): 82–83. doi: 10.1097/00007435-200102000-00004.
11. Stamm L.V. Global challenge of antibiotic-resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54 (2): 583–589. doi: 10.1128/AAC.01095-09.
12. Horner P.J. Azithromycin antimicrobial resistance and genital *Chlamydia trachomatis* infection: duration of therapy may be the key to improving efficacy. *Sex Transm Infect*. 2012; 88 (3): 154–6. doi: 10.1136/sextrans-2011-050385.
13. Kirkcaldy R.D., Augostini P., Asbel L.E. et al. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18 (6): 939–43. doi: 10.3201/eid1806.111590.
14. Ison C.A., Dillon J.A., Tapsall J.W. The epidemiology of global antibiotic resistance among *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus ducreyi*. *Lancet*. 1998; 351 (Suppl 3): 8–11. doi: 10.1016/s0140-6736(98)90003-4.
15. Jensen J.S., Bradshaw C.S., Tabrizi S.N. et al. Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. *Clin Infect Dis*. 2008; 47 (12): 1546–1553. doi: 10.1086/593188.
16. Bradshaw C.S., Jensen J.S., Tabrizi S.N. et al. Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12 (7): 1149–1152. doi: 10.3201/eid1207.051558.
17. Laxminarayan R., Bhutta Z., Duse A. et al. Drug resistance. In: D.T. Jamison, J.G. Breman, A.R. Measham, G. Alleyne, M. Claeson, D.B. Evans, eds. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd ed. Ch. 55. Washington, DC: World Bank; 2006.
18. Tibebe M., Shibabaw A., Medhin G., Kassu A. *Neisseria gonorrhoeae* non-susceptible to cephalosporins and quinolones in Northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2013; 13: 415. doi: 10.1186/1471-2334-13-415.
19. Chen X.S., Yin Y.P., Wei W.H. et al. High prevalence of azithromycin resistance to *Treponema pallidum* in geographically different areas in China. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19 (10): 975–979. doi: 10.1111/1469-0691.12098.
20. Brunner A., Nemes-Nikodem E., Mihalik N. et al. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending the national *Neisseria gonorrhoeae* reference laboratory of Hungary. *BMC Infect Dis*. 2014; 14: 433. doi: 10.1186/1471-2334-14-433.
21. Sood S., Kapil A. An update on *Trichomonas vaginalis*. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2008; 29: 7–14.
22. Доброхотова Ю.Э., Хрянин А.А., Шух Е.В., и др. Совет Экспертов: перспективные направления системной энзимотерапии в гинекологии. *РМЖ. Мать и дитя*. 2023; 6: 1–8. doi: https://doi.org/10.32364/2618-8430-2023-6-2-149-156. [Dobrokhotova Yu.E., Khryanin A.A., Shikh E.V., i dr. Sovet Ekspertov: perspektivnye napravleniya sistemnoy enzimoterapii v ginekologii. *RMZh. Mat' i Ditya*. 2023; 6: 1–8. doi: https://doi.org/10.32364/2618-8430-2023-6-2-149-156. (in Russian)]
23. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008. World Health Organization. Global Incidence and Prevalence of Selectable Curable Sexually Transmitted Infections. Available from: http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/HIV_AIDS_2001_2/en/
24. Patel A.L., Chaudhry U., Sachdev D. et al. An insight into the drug resistance profile and mechanism of drug resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Indian J Med Res*. 2011; 134: 419–31.
25. Allen V.G., Farrell D.J., Rebbapragada A. et al. Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (2): 703–712. doi: 10.1128/AAC.00788-10.
26. Golparian D., Hellmark B., Fredlund H., Unemo M. Emergence, spread and characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with *in vitro* decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in Sweden. *Sex Transm Infect*. 2010; 86 (6): 454–460. doi: 10.1136/sti.2010.045377.
27. Ison C.A., Hussey J., Sankar K.N. et al. Gonorrhoea treatment failures to cefixime and azithromycin in England, 2010. *Euro Surveill*. 2011; 16 (14): 19833.
28. Hathorn E., Dhasmana D., Duley L., Ross J.D. The effectiveness of gentamicin in the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*: A systematic review. *Syst Rev*. 2014; 3: 104. doi: 10.1186/2046-4053-3-104.
29. Unemo M., Golparian D., Skogen V. et al. *Neisseria gonorrhoeae* strain with high-level resistance to spectinomycin due to a novel resistance mechanism (mutated ribosomal protein S5) verified in Norway. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57 (2): 1057–61. doi: 10.1128/AAC.01775-12.
30. Soge O.O., Harger D., Schafer S. et al. Emergence of increased azithromycin resistance during unsuccessful treatment of *Neisseria gonorrhoeae* infection with azithromycin (Portland, OR, 2011) *Sex Transm Dis*. 2012; 39 (11): 877–9. doi: 10.1097/OLQ.0b013e3182685d2b.
31. Кубанов А.А., Соломка В.С., Рахматулина М.Р., Дерябин Д.Г. Устойчивость *Neisseria gonorrhoeae* к антимикробным препаратам и средства терапии гонококковой инфекции: вчера, сегодня, завтра. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2022; 98 (3): 15–23. doi: https://doi.org/10.25208/vdv1317. [Kubanov A.A., Solomka V.S., Rakhmatulina M.R., Deryabin D.G. Ustojchivost' *Neisseria gonorrhoeae* k antimikrobnym preparatam i sredstva terapii gonokokkovoy infektsii: vchera, segodnya, zavtra. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2022; 98 (3): 15–23. doi: https://doi.org/10.25208/vdv1317. (in Russian)]
32. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е. Заболеваемость сифилисом в Российской Федерации за период 2010–2016 гг. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2017; 93 (5): 16–25. doi: https://doi.org/10.25208/0042-4609-2017-93-5-16-25. [Kubanov A.A., Kubanova A.A., Melekhina L.E. Zaboлеваemost' sifilism v Rossijskoj Federatsii za period 2010–2016 gg. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2017; 93 (5): 16–25. doi: https://doi.org/10.25208/0042-4609-2017-93-5-16-25. (in Russian)]
33. Потекаев Н.Н., Фриго Н.В., Алмазова А.А., Лебедева Г.А. Эпидемиология сифилиса в современных условиях. *Клиническая дерматология и венерология*. 2015; 14 (1): 22–34. doi: https://doi.org/10.17116/klinderma2015122-34. [Potekaev N.N., Frigo N.V., Almazova A.A., Lebedeva G.A. Epidemiologiya sifilisa v sovremennykh usloviyakh. *Klinicheskaya Dermatologiya i Venerologiya*. 2015; 14 (1): 22–34. doi: https://doi.org/10.17116/klinderma2015122-34. (in Russian)]
34. Хрянин А.А., Сухарев Ф.А. Актуальные тенденции заболеваемости поздними формами сифилиса в Новосибирске. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2020; 96 (1): 28–33. doi: https://doi.org/10.25208/vdv552-2020-96-1-28-33. [Khryanin A.A., Sukharev F.A. Aktual'nye tendentsii zaboлеваemosti pozdnimi formami sifilisa v Novosibirske. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2020; 96 (1): 28–33. doi: https://doi.org/10.25208/vdv552-2020-96-1-28-33. (in Russian)]
35. South M.A., Short D.H., Knox J.M. Failure of erythromycin estolate therapy in in utero syphilis. *JAMA*. 1964; 190: 70–71. doi: 10.1001/jama.1964.03070140076020.
36. Fenton L.J., Light I.J. Congenital syphilis after maternal treatment with erythromycin. *Obstet Gynecol*. 1976; 47 (4): 492–4.
37. Ghanem K.G., Erbeling E.J., Cheng W.W., Rompalo A.M. Doxycycline compared with benzathine penicillin for the treatment of early syphilis. *Clin Infect Dis*. 2006; 42 (6): e45–9. doi: 10.1086/500406.
38. Wong T., Singh A.E., De P. Primary syphilis: serological treatment response to doxycycline/tetracycline versus benzathine penicillin. *Am J Med*. 2008; 121 (10): 903–8. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.04.042.
39. Соломка В.С., Комягина Т.М., Честков А.В., и др. Молекулярное типирование и устойчивость к макролидным антибиотикам у российских клинических изолятов *Treponema pallidum*: данные 2018–2019 гг. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2019; 95 (6): 29–36. doi: https://doi.org/10.25208/0042-4609-2019-95-6-29-36. [Solomka V.S., Komyagina T.M., Chestkov A.V., i dr. Molekulyarnoe tipirovaniye i ustojchivost' k makrolidnym antibiotikam u Rossijskikh klinicheskikh izol'atov *Treponema pallidum*: dannye 2018–2019 gg. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2019; 95 (6): 29–36. doi: https://doi.org/10.25208/0042-4609-2019-95-6-29-36. (in Russian)]
40. Meri T., Jokiranta T.S., Suhonen L., Meri S. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: Report of the first three cases from Finland and optimization of *in vitro* susceptibility testing under various oxygen concentrations. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (2): 763–7. doi: 10.1128/JCM.38.2.763-767.2000.
41. Rabiee S., Bazmani A., Matini M., Fallah M. Comparison of resistant and susceptible strains of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole using PCR method. *Iran J Parasitol*. 2012; 7 (3): 24–30.
42. Pérez S., Fernández-Verdugo A., Pérez F., Vázquez F. Prevalence of 5-nitroimidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in Oviedo, Spain. *Sex Transm Dis*. 2001; 28 (2): 115–6. doi: 10.1097/00007435-200102000-00010.
43. Upcroft J.A., Dunn L.A., Wal T. et al. Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* from highland women in Papua New Guinea. *Sex Health*. 2009; 6 (4): 334–338. doi: 10.1071/SH09011.
44. Conrad M.D., Gorman A.W., Schillinger J.A. et al. Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6 (3): e1573. doi: 10.1371/journal.pntd.0001573.

45. Handsfield H.H. Questioning azithromycin for chlamydial infection. *Sex Transm Dis.* 2011; 38 (11): 1028–1029. doi: 10.1097/OLQ.0b013e318227a366.
46. Batteiger B.E., Tu W., Ofner S. et al. Repeated Chlamydia trachomatis genital infections in adolescent women. *J Infect Dis.* 2010; 201: 42–51. doi: 10.1086/648734.
47. Drummond F., Ryder N., Wand H. et al. Is azithromycin adequate treatment for asymptomatic rectal chlamydia? *Int J STD AIDS.* 2011; 22 (8): 478–80. doi: 10.1258/ijsa.2011.010490.
48. Somani J., Bhullar V.B., Workowski K.A. et al. Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. *J Infect Dis.* 2000; 181 (4): 1421–7. doi: 10.1086/315372.
49. Rice R.J., Bhullar V., Mitchell S.H. et al. Susceptibilities of *Chlamydia trachomatis* isolates causing uncomplicated female genital tract infections and pelvic inflammatory disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39 (3): 760–762. doi: 10.1128/AAC.39.3.760.
50. Filardo S., Di Pietro M., Tranquilli G. et al. Biofilm in genital ecosystem: a potential risk factor for *Chlamydia trachomatis* infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2019; 2019: 1672109. doi: 10.1155/2019/1672109.
51. Rosca A.S., Castro J., Sousa L.G.V., Cerca N. Gardnerella and vaginal health: the truth is out there. *FEMS Microbiol Rev.* 2020 Jan 1; 44 (1): 73–105. doi: 10.1093/femsre/fuz027.
52. Wiggins R., Hicks S.J., Soothill P.W. et al. Mucins and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sex Transm Infect* 2001; 77: 402–408. doi: 10.1136/sti.77.6.402.
53. Olmsted S.S., Meyn L.A., Rohan L.C. et al. Glycosidase and proteinase activity of anaerobic Gram-negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis.* 2003; 30: 257–261. doi: 10.1097/00007435-200303000-00016.
54. Moncla B.J., Chappell C.A., Mahal L.K. et al. Impact of bacterial vaginosis, as assessed by Nugent criteria and hormonal status on glycosidases and lectin binding in cervicovaginal lavage samples. *PLoS One.* 2015; 10: e0127091. doi: 10.1371/journal.pone.0127091. eCollection 2015.
55. Wiesenfeld H.C., Hillier S.L., Krohn M.A. et al. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 663–8. doi: 10.1086/367658.
56. Borgdorff H., Gautam R., Armstrong S.D. et al. Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier. *Mucosal Immunol.* 2016; 9: 621–633. doi: 10.1038/mi.2015.86.
57. Ross J.D., Jensen J.S. *Mycoplasma genitalium* as a sexually transmitted infection: Implications for screening, testing, and treatment. *Sex Transm Infect.* 2006; 82 (4): 269–271. doi: 10.1136/sti.2005.017368.
58. Couldwell D.L., Tagg K.A., Jeffreys N.J., Gilbert G.L. Failure of moxifloxacin treatment in *Mycoplasma genitalium* infections due to macrolide and fluoroquinolone resistance. *Int J STD AIDS.* 2013; 24 (10): 822–828. doi: 10.1177/0956462413502008.
59. Wood G.E., Jensen N.L., Astete S. et al. Azithromycin and doxycycline resistance profiles of U.S. *Mycoplasma genitalium* strains and their association with treatment outcomes. *J Clin Microbiol.* 2021; 59 (11): e0081921. doi: 10.1128/JCM.00819-21.
60. 2018 BASHH UK national guidance for the management of infection with *Mycoplasma genitalium*. BASHH UK Natl Guidel 2018 <http://www.sti.guidelines.org.au/sexually-transmissible-infections/mycoplasma-genitalium#management>
61. Эйдельштейн И.А., Руднева Н.С., Романов А.В., и др. *Mycoplasma genitalium*: мониторинг распространения мутаций, связанных с резистентностью к макролидам в России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2022; 24 (1): 52–60. doi: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2022.1.52-60>. [Ejdel'shtejn I.A., Rudneva N.S., Romanov A.V., i dr. *Mycoplasma genitalium*: monitoring rasprostraneniya mutatsij, svyazannykh s rezistentnost'yu k makrolidam v Rossii. Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya. 2022; 24 (1): 52–60. doi: <https://doi.org/10.36488/cmasc.2022.1.52-60>. (in Russian)]
62. Jensen J.S., Cusini M., Gomberg M., Moi H. European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016; 30 (10): 1650–1656. doi: 10.1111/jdv.13849.
63. Australian Sexual Health Alliance 2018. *Mycoplasma genitalium* — Australian STI management guidelines for primary care. <http://www.sti.guidelines.org.au/sexually-transmissible-infections/mycoplasma-genitalium#management>
64. Bhattacharai S.R., Yoo S.Y., Lee S.W., Dean D. Engineered phage-based therapeutic materials inhibit *Chlamydia trachomatis* intracellular infection. *Biomaterials.* 2012; 33 (20): 5166–5174. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.054.
65. Lovett M.A. Recombinant DNA derived antigens of *Treponema pallidum*. 1984, Google Patents.
66. Piekarowicz A., Majchrzak M., Klyz A., Adamczyk-Poplawska M. Analysis of the filamentous bacteriophage genomes integrated into *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 chromosome. *Pol J Microbiol.* 2006; 55 (4): 251–260.
67. Zairi A., Tangy E., Ducos-Galand M. et al. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial peptides from amphibian skin, dermaseptin, and derivatives. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 57 (3): 319–324. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.006. Epub 2007 Jan 23.
68. Хрянин А.А. Биоплёнки микроорганизмов: современные представления. Антибиотики и химиотер, 2020; 65 (5–6): 70–77. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-5-6-70-77>. [Khryanin A.A. Microbial biofilms: modern concepts. Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy. 2020; 65 (5–6): 70–77. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-5-6-70-77>. (in Russian)]
69. Fauci A.S., Marston L.D. The perpetual challenge of antimicrobial resistance. *JAMA.* 2014; 311 (18): 1853–4. doi: 10.1001/jama.2014.2465.
70. Korenromp E.L., Wi T., Resch S., et al. Costing of national STI program implementation for the Global STI control strategy for the Health Sector, 2016–2021. *PLoS One.* 2017; 12 (1): e0170773. doi: 10.1371/journal.pone.0170773. eCollection 2017.

Информация об авторах

Хрянин Алексей Алексеевич — д. м. н., профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России; президент РОО «Ассоциация акушеров-гинекологов и дерматовенерологов», Новосибирск, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9248-8303

About the authors

Aleksey A. Khryanin — D. Sc. in Medicine, Professor of the Dermatovenereology and Cosmetology Department, Novosibirsk State Medical University; President of Association of Obstetrician-Gynecologists and Dermatologists, Novosibirsk, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9248-8303

**Рецензия на монографию С. К. Ярового, А. Л. Хохлова
«Практические вопросы рациональной антибактериальной
терапии». Издательство ОКИ, 2023; 288 с.: ил. ISBN 978-5-4465-3951-2**

**Review of the Monograph by S. K. Yarovoy, A. L. Khokhlov
«Practical Issues of Rational Antibacterial Therapy».
OKI Publishing House, 2023; 288 pp.: ill. ISBN 978-5-4465-3951-2**

На сегодняшний день проведено большое количество исследований, посвящённых антибактериальной терапии неспецифических инфекционно-воспалительных заболеваний органов. Выводы этих работ достаточно противоречивы, и практическому врачу бывает трудно сориентироваться в таком количестве информации и обоснованно сделать выбор. Кроме того, основная часть новых высокоэффективных антибактериальных препаратов достаточно дорогостоящая, вследствие чего администрация ЛПУ, стараясь сократить расходы на фармакотерапию и не выходя за рамки оплаты стандарта, ограничивает применение этих препаратов, тем самым ещё более затрудняя выбор. Поэтому актуальность настоящей работы, в которой авторы упорядочивают выбор широко распространённых антибактериальных препаратов применительно к нынешней экономической и эпидемиологической ситуации, несомненна.

Вопросы лечения инфекционно-воспалительных заболеваний в условиях тяжёлой сопутствующей патологии в настоящее время разработаны недостаточно. Особенно спорным моментом является эмпирическая терапия. В частности, сегодня отмечается тенденция у заведомо осложнённых больных начинать эмпирическую антибактериальную терапию с резервных препаратов. Причём нередко происходит это без всякого микробиологического обоснования. Авторы подробно рассматривают особенности применения противомикробных препаратов в условиях почечной и печёночной недостаточности, что, несомненно, крайне актуально для практического здравоохранения.

Несомненным преимуществом данной монографии является рассмотрение особенностей внутригруппового выбора антибактериальных

препаратов. Авторы отмечают, что у представителей одной группы фармакологические свойства иногда очень схожи, а доказательная база часто не в состоянии помочь в решении данной задачи. Вопрос обоснованного внутригруппового выбора антибактериального препарата в современной научной литературе освещён явно недостаточно. Количество клинических исследований, посвящённых сравнению препаратов в рамках одной фармакологической группы, очень ограничено. Между тем вопрос «Какой препарат более эффективен и по сравнению с чем?» для практического здравоохранения очень актуален. Причём как на уровне лечащих врачей, так и на уровне администрации, принимающих решения о лекарственном обеспечении ЛПУ. А может быть, в данной конкретной ситуации они совершенно равноценны по эффективности и безопасности? Тогда решающее значение приобретает экономический аспект — в современной ситуации именно экономическая составляющая зачастую является определяющей в выборе медицинской технологии.

Следствием освоения методики внутригруппового выбора является расширение спектра назначаемых конкретным врачом лекарственных средств, более полное использование их фармакологических свойств, что в конечном итоге повышает качество оказания медицинской помощи.

В заключение можно отметить, что разработанные рекомендации вполне исполнимы любым ЛПУ и экономически доступны.

Монография представляет интерес для клинических фармакологов, а также для врачей всех клинических специальностей, слушателей циклов повышения квалификации, студентов старших курсов медицинских ВУЗов.

Автор рецензии

Козлов Роман Сергеевич — д. м. н., профессор, академик РАН, ректор ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск, Россия

About the author

Roman S. Kozlov — D. Sc. in Medicine, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Rector of the Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

Памяти Беседновой Наталии Николаевны (02.02.1935 — 23.09.2023)

**In memory
of Natalia Nikolaevna Besednova
(02/02/1935 — 09/23/2023)**

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора с прискорбием сообщает, что 23 сентября 2023 г. на 89-м году жизни скончалась Наталия Николаевна Беседнова, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, действительный член Российской академии наук, лауреат Государственной премии СССР, выдающийся учёный, блестящий организатор, прекрасный педагог и замечательный человек.

Наталия Николаевна Беседнова родилась 2 февраля 1935 г. в г. Клязьма Московской области. После окончания в 1959 г. Первого Московского медицинского института им. И. М. Сеченова по распределению приехала в г. Владивосток, где начала работать врачом-эпидемиологом городской санитарно-эпидемиологической станции. С 1960 г. трудовая деятельность Н. Н. Беседновой связана с Научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии, где она прошла путь от младшего научного сотрудника до руководителя лаборатории, заместителя директора по научной работе и директора Института, которым успешно руководила на протяжении двух десятилетий.

В 1969 г. Наталия Николаевна защитила кандидатскую, в 1980 г. — докторскую диссертацию на тему «Экспериментальное и клинико-эпидемиологическое изучение псевдотуберкулёзной инфекции». В 1991 г. ей было присвоено звание профессора по специальности «Аллергология и иммунология». В 1993 г. Н. Н. Беседнова была избрана членом-корреспондентом, в 2000 г. — академиком Российской академии медицинских наук. С 2013 г. Н. Н. Беседнова — действительный член Российской академии наук.

В последние годы своей научной деятельности Н. Н. Беседнова занимала должность главного научного сотрудника Института.

Научная деятельность Н. Н. Беседновой была сосредоточена на проблемах диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний. Под её руководством выполнены циклы обширных исследований по иммунологии брюшного тифа, псевдотуберкулёза, дифтерии. В 1989 г. за работу по изучению нового клинико-эпидемического проявления псевдотуберкулёзной инфекции у человека (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки)



в числе группы сотрудников Института Н. Н. Беседнова была удостоена Государственной премии СССР.

В 1970-х гг. Наталья Николаевна явилась инициатором создания и развития нового научного направления по изучению клеточных и молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия биологически-активных веществ из гидробионтов Тихого океана, организовав широкое сотрудничество с Тихоокеанским институтом биорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Тихоокеанским научно-исследовательским рыбохозяйственным центром, Тихоокеанским государственным медицинским университетом и практическими учреждениями здравоохранения. В результате исследований, координируемых Н. Н. Беседновой, были получены новые данные об иммуномодулирующих, антибактериальных, противовирусных, противоопухолевых, антиадгезивных, антиэндотоксических, проапоптотических, гепатозащитных, гиполипидемических свойствах биологически-активных веществ морского происхождения, установлены клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия, обоснована возможность конструирования инновационных лекарственных средств на их основе, разработаны экологически безопасные продукты функционального питания и биологически активных добавок к пище, удостоенные золотых и платиновых знаков качества, дипломов победителей национальных и зарубежных конкурсов. Н. Н. Беседнова являлась научным руководителем «Клинико-диагностического центра геронтологии и биотерапии», созданного при её участии на базе терапевтического отделения Медицинского объ-

единения ДВО РАН, где проводится оценка клинической эффективности препаратов на основе биологически активных веществ из объектов наземной и морской флоры и фауны Дальнего Востока.

Н. Н. Беседновой создана школа высококвалифицированных специалистов в области микробиологии и иммунологии, многие из которых в настоящее время работают на кафедрах в вузах, заведуют лабораториями института, отделениями клиник. Под её руководством защищены 31 кандидатская и 6 докторских диссертаций. Н. Н. Беседнова является автором более 300 печатных работ, 32 патентов, 15 монографий, пособий для практических врачей, технологической документации.

С 2014 г. Н. Н. Беседнова возглавила работу Объединённого Учёного Совета ДВО РАН по медицинским и физиологическим наукам, многие годы являлась членом диссертационных советов ДКМ 208.007.02 и Д 307.012.01, членом Координационного Совета и Чрезвычайной противоэпидемической комиссии при Департаменте здравоохранения администрации Приморского края, членом редакционных коллегий журнала «Антибиотики и химиотерапия», «Бюллетень Сибирского отделения

РАМН», «Тихоокеанский медицинский журнал», «Здоровье. Медицинская экология. Наука».

В 2001 г. Н. Н. Беседновой было присвоено почётное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации». Её весомый вклад в науку отмечен высокими наградами СССР и Российской Федерации: орденом «Знак Почёта», медалью ВДНХ, орденом Дружбы, медалью им. академика В. И. Покровского.

На протяжении всей своей трудовой деятельности Наталья Николаевна Беседнова оставалась интеллигентным, добрым и внимательным к коллегам и друзьям человеком, отдавала все силы, знания и опыт сотрудникам института.

Ушла из жизни замечательная женщина. Её не забудут те, кто когда-либо общался с ней. Нам всем будет не хватать доброго друга и мудрого наставника. Светлая память о ней навсегда сохранится в наших сердцах.

Редколлегия, редакционный совет и редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия» выражает глубокое соболезнование родным и близким Натальи Николаевны Беседновой и вместе с ними скорбят о её безвременной кончине.