

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 69



3-4'2024

Научно-практический журнал

Учредители:

ISSN 0235-2990

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

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

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

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

ИЗДАТЕЛЬ:

Издательство «ОКИ»



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

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

Установочный тираж 5000 экз.

Типография:
ООО «Литера»

Дата выхода: апрель 2024

Свободная цена

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 69

3–4'2024

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор

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

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

Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Научные редакторы

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Founders:

ISSN 0235-2990

**Ministry of Health
of the Russian Federation**

State Scientific Center for Antibiotics

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

Founded in 1956

Editorial office address:

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

Advertising Department:

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

Publisher:

Izdatelstvo «OKI»



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

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

Circulation: 5000 copies

Tipography:
ООО «Литера»

Release Date: April 2024
Free price

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Volume 69

3–4'2024

MONTHLY JOURNAL

Editor-in-Chief

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

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

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

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

Scientific Editors

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

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

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

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

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

Экспериментальные исследования

- Еникиев Р. Р., Захарчук Л. М.
Исследование резистентности к антибиотикам бактерий рода *Bacillus*, выделенных из Международной космической станции и больницы лаборатория Гусев Е. А., Романовская А. Д., Галкина А. Ю., Лучинин Д. Н., Молчанова Е. В.
Характеристика чувствительности штаммов вируса Западного Нила 2 генотипа к противовирусным препаратам
Логина С. Я., Шукина В. Н., Савенко С. В., Рубцов В. В., Борисевич С. В., Чижов Д. Л., Русинов Г. Л., Вербицкий Е. В., Чарушин В. Н., Котовская С. К., Русинов В. Л.
Сравнительный анализ противовирусной активности различных препаратов на основе 6-фтор-3-гидрокси-2-пиразинкарбоксамида (фавипиравир) в отношении возбудителя COVID-19
Файзулов Е. Б., Ленёва И. А., Смирнов В. С., Смирнова Д. И., Грачева А. В., Корчевая Е. Р., Хохлова Д. М., Кудрявцева Т. А., Петленко С. В., Заплутанов В. А.
Противовирусная активность препарата Цитовир®-3 в отношении возбудителя ротавирусной инфекции человека *in vitro*
Алиева К. Н., Голикова М. В., Кондратьева Д. А., Кузнецова А. А.
Прогнозирование эффективности азтреонама в отношении *Klebsiella pneumoniae* по результатам оценки чувствительности бактерии к антибиотику при увеличенном инокуляте

Клинические исследования и практика

- Серебрякова Е. Н., Шилова Т. В., Кожевников А. С., Кильмухаметова Э. И.
Случай первичного иммунодефицита с иммунной дисрегуляцией: особенности клинической манифестации и сложности диагностики
Кушхова Д. Х., Камбачокова З. А., Мизиев С. И., Темирсултанова Х. А., Махмаева М. В., Хацуква А. Х., Бахалаева С. М., Арцхаева Д. Р., Кушхов М. Р., Соблирова Д. З., Карова Ф. Х. Мамхегова А. Ч.
Показатели цитокиновых маркеров у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Обзоры

- Генатуллина Г. Н., Ясенявская А. Л., Цибизова А. А., Самотруева М. А.
Нанокapsулированные системы: перспективные биомедицинские инициативы в фармакологии
Дунаева М. Н.
Молекулярно-генетические механизмы репликации вируса гриппа А и механизмы действия этиотропных препаратов
Баранова М. М., Муравьева Н. В., Белов Б. С., Диатроптов М. Е., Буханова Д. В.
Иммуногенность, эффективность и безопасность трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины у больных воспалительными заболеваниями суставов, получающих современную противоревматическую терапию

Некролог

- Памяти Леонида Александровича Блатуна (29.03.1941 — 10.03.2024)

Experimental Research

- 4 Yenikeev Radmir R., Zakharchuk Leonid M.
Study of Antibiotic Resistance of *Bacillus* Bacteria Isolated from the International Space Station and a Hospital Laboratory of Progesterone Receptors Expression
14 Gusev Eugeni A., Romanovskaya Arina D., Galkina Anastasiya Yu., Luchinin Dmitry N., Molchanova Elena V.
Sensitivity Characteristics of Genotype 2 West Nile Virus Strains to Anti-Viral Drugs
21 Loginova Svetlana Ya., Shchukina Veronika N., Savenko Sergey V., Rubtsov Vladimir V., Borisevich Sergey V., Chizhov Dmitrii L., Rusinov Gennady L., Verbitskiy Egor V., Charushin Valery N., Kotovskaya Svetlana K., Rusinov Vladimir L.
Comparative Analysis of the Antiviral Activity of Various Drugs Based on 6-Fluoro-3-Hydroxy-2-Pyrazinecarboxamide (Favipiravir) Against COVID-19
31 Faizuloev Evgeny B., Leneva Irina A., Smirnov Vyacheslav S., Smirnova Daria I., Gracheva Anastasiya V., Korchevaya Ekaterina R., Khokhlova Daria M., Kudryavtseva Tatyana A., Petlenko Sergey V., Zaplutanov Vasily A.
Antiviral Activity of Cytovir®-3 Against Human Rotavirus Infection Agent *in vitro*
42 Alieva Kamilla N., Golikova Maria V., Kondratieva Daria A., Kuznetsova Anastasiya A.
Prediction of Aztreonam Effectiveness Against *Klebsiella pneumoniae* Based on the Results of Antimicrobial Susceptibility Testing with Increased Inoculum

Clinical Research and Practice

- 51 Serebryakova Elena N., Shilova Tatiana V., Kozhevnikov Artem S., Kilmukhametova Elina I.
A Case of Primary Immunodeficiency with Immune Dysregulation: Features of Clinical Manifestation and Diagnostic Difficulties
58 Kushkhova Diana H., Kambachokova Zareta A., Miziev Suleiman I., Temirsultanova Khava A., Makhmaeva Makka V., Khatsukova Alina H., Bakhalaeva Selima M., Artskhaeva Dana R., Kushkhov Murat R., Soblirova Diana Z., Karova Fardaus H., Mamhegova Aiza Ch.
Indicators of Cytokine Markers in Patients with Cardiovascular Diseases

Reviews

- 62 Genatullina Guzel N., Yasyayvskaya Anna L., Tsibizova Alexandra A., Samotrueva Marina A.
Nanoencapsulated Systems: Promising Biomedical Initiatives in Pharmacology
73 Dunaeva Mariya N.
Molecular Genetic Mechanisms of Influenza A Virus Replication and Mechanisms of Action of Etiotropic Medications
95 Baranova Marina M., Muravyeva Natalia V., Belov Boris S., Diatroptov Mikhail E., Bukhanova Daria V.
Immunogenicity, Effectiveness, and Safety of Trivalent Inactivated Influenza Split Vaccine in Patients with Inflammatory Joint Diseases Receiving Modern Antirheumatic Therapy

Obituary

- 102 In Memory of L. A. Blatun (29.03.1941 — 10.03.2024)

* 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.

Исследование резистентности к антибиотикам бактерий рода *Bacillus*, выделенных из Международной космической станции и больничной лаборатории

*Р. Р. ЕНИКЕЕВ, Л. М. ЗАХАРЧУК

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме

Актуальность. К настоящему времени мало данных о клинических характеристиках бактерий рода *Bacillus*, обитающих в чистых комнатах и асептических помещениях. **Цель исследования** — идентификация и определение устойчивости к клинически значимым антибиотикам штаммов *Bacillus*, выделенных с Международной космической станции и медицинской лаборатории. **Материалы и методы.** Идентификация изолятов осуществлена методами анализа гена 16S рРНК, MALDI-TOF и полногеномного секвенирования. Чувствительность к антибиотикам оценивали диско-диффузионным методом. **Результаты.** У семи штаммов *Bacillus* из 13 обнаружена резистентность к имипенему, у каждого из *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 — к имипенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину и норфлоксацину. Полногеномное секвенирование *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 и *B. safensis* SE192, устойчивых к имипенему и меропенему, показало, что резистентность к ним обеспечивает ген *TEM-116*. Кроме *TEM-116*, устойчивость *B. cereus* LR2HG21 к имипенему и меропенему, а *B. cereus* HSA01 и HSA03 к имипенему обеспечивают гены *Bcl* и/или *BclI*. Резистентность к эритромицину у *B. subtilis* SE15 и *B. subtilis* SE171 кодирует ген *mphK*. **Заключение.** У разных штаммов *Bacillus* устойчивость к определённому антибиотику может обеспечиваться одним или несколькими механизмами одновременно.

Ключевые слова: Международная космическая станция; бактерии рода *Bacillus*; устойчивость к антибиотикам; гены устойчивости; *Bacillus cereus*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus safensis*.

Для цитирования: Еникеев Р. Р., Захарчук Л. М. Исследование резистентности к антибиотикам бактерий рода *Bacillus*, выделенных из Международной космической станции и больничной лаборатории. *Антибиотики и химиотерапия*. 2024; 69 (3–4): 4–13. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-4-13>. EDN: BKZWDU.

Study of Antibiotic Resistance of *Bacillus* Bacteria Isolated from the International Space Station and a Hospital Laboratory

*RADMIR R. YENIKEYEV, LEONID M. ZAKHARCHUK

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract

Background. To date, there is little data on the clinical characteristics of *Bacillus* bacteria found in clean rooms and aseptic facilities. **The aim of the study** was to identify and determine the resistance of *Bacillus* strains isolated from the International Space Station and medical laboratory to clinically significant antibiotics. **Methods.** Isolates were identified using 16S rRNA gene analysis, MALDI-TOF, and whole-genome sequencing. Antibiotic sensitivity was assessed using the disk diffusion method. **Results.** Seven *Bacillus* strains out of 13 showed resistance to imipenem, and each of *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, and HSA12 showed resistance to imipenem, ciprofloxacin, levofloxacin, and norfloxacin. Whole-genome sequencing of *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 and *B. safensis* SE192, resistant to imipenem and meropenem, showed that resistance to them is provided by the *TEM-116* gene. In addition to *TEM-116*, the resistance of *B. cereus* LR2HG21 to imipenem and meropenem, and *B. cereus* HSA01 and HSA03 to imipenem, is provided by the *Bcl* and/or *BclI* genes. Resistance to erythromycin in *B. subtilis* SE15 and *B. subtilis* SE171 is encoded by the *mphK* gene. **Conclusion.** Resistance to a particular antibiotic in different *Bacillus* strains can be achieved by one or more mechanisms simultaneously.

Keywords: International Space Station; bacteria of the *Bacillus* genus; antibiotic resistance; resistance genes; *Bacillus cereus*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus safensis*.

For citation: Yenykeyev R. R., Zakharchuk L. M. Study of antibiotic resistance of *Bacillus* bacteria isolated from the International Space Station and a hospital laboratory. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (3–4): 4–13. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-4-13>. EDN: BKZWDU.

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



*Correspondence to: 1–12 Leninskiye Gory, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia. E-mail: radmir.yenykeyev@gmail.com



EDN: BKZWDU

Введение

Рабочие поверхности и воздушные пространства обитаемых помещений на Земле характеризуются микробными сообществами, состоящими из различных видов бактерий и грибов. С помощью влажной уборки и естественной вентиляции в жилых и рабочих помещениях количество микроорганизмов снижают, хотя оно остаётся достаточно высоким.

Однако во многих асептических помещениях, например, родильных отделениях, операционных, цехах для производства медицинских препаратов и других, количество микроорганизмов на поверхностях оборудования и в воздухе поддерживают на минимальном уровне уже с помощью воздушных фильтров, дезрастворов, ультрафиолетового облучения. Лабораторные комнаты для отбора проб крови в больницах являются одним из видов таких асептических помещений. Микроорганизмы в лабораторных комнатах уничтожаются воздействием УФ-излучения и дезинфицирующих средств, обладающих мутагенным действием. Выжившие после такой антисептической обработки микроорганизмы часто приобретают множественную лекарственную устойчивость (МЛУ), связанную ещё и с тем, что посетители лечебных учреждений часто подвергаются лечению различными антибиотиками [1, 2].

Другим видом асептических помещений является Российский сегмент Международной космической станции (РС МКС), который представляет собой закрытую искусственную среду в космосе с собственной экологической нишей, характеризующейся несколькими уникальными для микроорганизмов параметрами, такими как радиация, изолированность и микрогравитация [3]. При этом, в отличие от наземных асептических помещений, например лаборатории для отбора анализов крови, на РС МКС длительное время сохраняется постоянный экипаж и формируется устойчивая микробиота из-за отсутствия постоянного притока новых штаммов микроорганизмов. Кроме того, в герметичной МКС, которая насыщена сложнейшим оборудованием и где работает экипаж, не применяются некоторые традиционные на Земле методы борьбы с микроорганизмами — УФ-облучение, ядовитые дезинфицирующие растворы, газы [4].

Устойчивость к УФ-облучению и дезинфицирующим средствам чаще всего обнаруживают спорообразующие бактерии. Так, установлено, что на МКС одной из самых распространённых групп микроорганизмов являются спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, некоторые виды которого способны вызывать множество заболеваний [5, 6]. Однако информации о клинических характеристиках бактерий рода *Bacillus*, обитающих в чистых комнатах и асептических помещениях, ещё очень мало.

Цель работы — выделение с рабочих поверхностей Российского сегмента Международной космической станции (РС МКС) и лаборатории для отбора проб крови изолятов спорообразующих штаммов бактерий рода *Bacillus*, их идентификация, определение устойчивости к ряду клинически значимых антибиотиков и выявление возможных генетических детерминант этой резистентности.

Материал и методы

Пробы с поверхностей приборов РС МКС и больницы лаборатории отбирали с помощью ватных тампонов на площади 100 см². Получение первичных изолятов бактерий и чистых культур спорообразующих бактерий из образцов, полученных из МКС и больницы лаборатории, осуществляли, как описано ранее [7, 8].

Исследование морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков бактерий, а также дифференциация бактерий рода *Bacillus* от представителей сходных родов бактерий, образующих эндоспores, основывались на соответствующих руководствах [9]. Идентификацию чистых культур бактерий по сумме признаков, предположительно относящихся к роду *Bacillus*, осуществляли анализом 16S рРНК [7, 8] и методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) на приборе MALDI-TOF autoflex III L200 (Biotyper Bruker, Германия) [10].

Для оценки чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом использовали агар Мюллера–Хинтона состава (г/л): мясной экстракт сухой — 3,0; гидролизат казеина сухой — 17,5; крахмал растворимый — 0,5; агар — 18,0; вода дистиллированная — до 1 л, pH = 7,0. Суспензию бактерий 0,5 единиц по стандарту мутности Мак-Фарланда наносили на поверхность питательной среды в чашках Петри в количестве 200 мкл и распределяли с помощью стеклянного шпателя. Диски с антибиотиками (Научно-исследовательский центр фармакотерапии, Россия) наносили на поверхность засеянной среды, через 15 мин после инокуляции среды в чашках суспензией бактерий. Через 15 мин чашки с дисками помещали в термостат и инкубировали при 35°C в течение 20 ч [11]. Определяли специфические значения диаметров зон подавления роста бактерий антибиотиками, используемыми для оценки штаммов, в соответствии с клиническими категориями «чувствительный» или «резистентный» по таблицам критериев интерпретации результатов, представленным European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [11]. При этом по таблицам критериев изоляты, отнесённые к категории скрининг-отрицательных к норфлоксацину, могут быть отмечены как «чувствительные к повышенному воздействию» ципрофлоксацина и левофлоксацина, то есть к чувствительным штаммам (S), а изоляты, отнесённые к категории положительных по скринингу к норфлоксацину, могут быть устойчивы к ципрофлоксацину и левофлоксацину, и, следовательно, могут быть отнесены к резистентным к ципрофлоксацину и левофлоксацину штаммам (R).

Для полногеномного секвенирования выделение ДНК из клеток штаммов, выращенных на жидкой среде с мясопептонным бульоном и 1% глюкозы, проводили с помощью набора реактивов Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals, США) по протоколу производителя. Геномную ДНК секвенировали с использованием платформ Illumina MiSeq (Illumina Inc., США). Библиотеки Illumina были подготовлены с использованием набора библиотек Kapa Hyperplus (Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные последовательности были идентифицированы с использованием программы сверхбыстрой

классификации метагеномных последовательностей Kraken [12]. Установление наличия в геноме штаммов бактерий рода *Bacillus* генов устойчивости к антибиотикам осуществляли с помощью базы данных The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [13]. Результаты в их конечном виде получали путём вычисления среднего арифметического (\bar{X}) из результатов всех повторностей (X_n) при условии, что они различались не более чем на 10% ($|X_n - \bar{X}| \leq 0,05 X$). При этом расчёт среднего арифметического проводили, исключая «сомнительные результаты» («X»), не входящие в доверительный интервал $|X_n - \bar{X}| = t \sigma$, где \bar{X} — среднее арифметическое без учёта «сомнительных результатов», t — нормированное отклонение при $p=0,95$ для малых выборок ($n < 30$), а σ — среднее квадратичное отклонение без учёта «X».

Результаты

Получение и первичная характеристика штаммов бактерий. Получение первичных изолятов бактерий осуществляли высевами образцов материалов, отобраных методом смывов с поверхностей оборудования на РС МКС и в больничной лаборатории для отбора проб крови, на плотные питательные среды, такие как мясо-пептонный агар с 1% глюкозы и бульон сусло-агар [7, 8]. Из первичных изолятов были получены чистые культуры спорообразующих бактерий. Затем исследовали морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки соответствующих штаммов. Определяли такие свойства выделенных бактерий, как форма и диаметр клеток, образование эндоспор, окраска по Граму, отношение к кислороду, способность синтезировать каталазу и оксидазу, образование кислоты при сбраживании глюкозы, гидролиз крахмала, восстановление нитратов и некоторые другие физиологические и биохимические признаки. По сумме фенотипических признаков с использованием соответствующих руководств [9] осуществлена дифференциация исследуемых штаммов от бактерий сходных родов, образующих эндоспоры, что позволило предположительно отнести 13 штаммов спорообразующих бактерий к роду *Bacillus*.

Идентификация штаммов с помощью анализа гена 16S рPHK. Все штаммы спорообразующих бактерий, выделенные из проб, полученных из РС МКС и больничной лаборатории, на основании анализа последовательностей 16S рPHK были отнесены к роду *Bacillus* (табл. 1). При этом штаммы, выделенные из больничной лаборатории, были определены до вида как *Bacillus cereus* HSA01, *Bacillus cereus* HSA03, *Bacillus cereus* HSA12, *B. subtilis* HSA06, *B. amyloliquefaciens* HSA09. В то же время штаммы бацилл, выделенные из проб, доставленных с РС МКС, идентифицировать до конкретного вида с помощью анализа 16S рPHK не удалось, так как последовательности гена 16S рPHK у этих штаммов оказались одновременно близки к нескольким видам рода *Bacillus*. Эти космические штаммы были обозначены как *Bacillus* sp. LR2HG21, *Bacillus* sp. HEP3B2, *Bacillus* sp. PWN2D, *Bacillus* sp.

DLA64, *Bacillus* sp. SE15, *Bacillus* sp. SE21, *Bacillus* sp. SE171, *Bacillus* sp. SE192 (см. табл. 1).

Идентификация штаммов с помощью MALDI-TOF. Дальнейшую идентификацию штаммов бактерий, по сумме признаков, предположительно отнесённых к роду *Bacillus*, осуществляли методом масс-спектрометрии MALDI-TOF [10]. Все 13 штаммов бактерий — 8 штаммов, выделенных с РС МКС и 5 штаммов, полученных с больничной лаборатории, с использованием масс-спектрометрии, были отнесены к роду *Bacillus*. Штаммы из РС МКС *Bacillus* sp. LR2HG21 и *Bacillus* sp. DLA64 идентифицированы до вида как *B. cereus* LR2HG21 и *B. subtilis* DLA64 соответственно (см. табл. 1). Три штамма бацилл из больничной лаборатории — HSA01, HSA03, HSA12 идентифицированы, как и методом анализа гена 16S рPHK, до вида как *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12, а штаммы HSA06 и HSA09 — как *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09, соответственно (см. табл. 1).

Определение чувствительности к антибиотикам. У выделенных с РС МКС и больничной лаборатории штаммов бацилл изучали устойчивость к действию ряда антибиотиков диско-диффузионным методом [11]. В последнем выпуске EUCAST 2023 [11] присутствуют критерии интерпретации для оценки устойчивости бактерий *Bacillus* spp. с помощью диско-диффузионного метода для таких антибиотиков, как имипенем, меропенем, ципрофлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, ванкомицин, эритромицин, клиндамицин и линезолид, поэтому именно эти антибиотики были использованы в нашей работе. По размерам зон подавления роста бактерии соответствующим антибиотиком этот штамм можно было отнести к категориям чувствительный (S) или резистентный (R), в соответствии с таблицами, представленными в EUCAST 2023.

Изучение устойчивости к перечисленным антибиотикам 13 штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из РС МКС и больничной лаборатории, показало, что семь из них проявляют резистентность к первому из исследуемых антибиотиков — имипенему (см. табл. 1). К следующему антибиотику меропенему большинство штаммов чувствительны и только два штамма, выделенные из РС МКС, устойчивы — LR2HG21 и SE171. К таким антибиотикам, как ципрофлоксацин, левофлоксацин и норфлоксацин проявили устойчивость только один штамм, полученный из РС МКС — LR2HG21 и три штамма бацилл, выделенных из больничной лаборатории — HSA01, HSA03, HSA12 (см. табл. 1). Все 13 штаммов из РС МКС и больничной лаборатории оказались чувствительными к ванкомицину и клиндамицину. К эритромицину проявили резистентность только три штамма из РС МКС — SE15, SE21 и SE171 (см. табл. 1). К последнему ан-

Таблица 1. Диаметры зон подавления роста штаммов бактерий рода *Bacillus* (в мм), выделенных из РСМКС и больничной лаборатории, на среде Мюллера-Хинтон под действием дисков с различными антибиотиками

Table 1. Growth inhibition zone diameters (in millimeters) of *Bacillus* bacterial strains isolated from the ISS RS and the hospital laboratory on Mueller-Hinton agar plates exposed to various antibiotic discs.

Штамм бактерий по 16S рРНК	Антибиотик										Штамм на основании секвенирования
	имипенем	меропенем	ципрофлоксацин	левофлоксацин	ванкомицин	эритромицин	клиндамицин	линезолид	на основании MALDI-TOF		
<i>Bacillus</i> sp. LR2HG21	26 (R)	24 (R)	25 (R)	24 (R)	22 (S)	25 (S)	25 (S)	27 (S)	25 (S)	25 (S)	<i>B. cereus</i> LR2HG21
<i>Bacillus</i> sp. HEP3B2	27 (R)	26 (S)	25 (S)	33 (S)	22 (S)	28 (S)	24 (S)	37 (S)	—	—	<i>B. safensis</i> HEP3B2
<i>Bacillus</i> sp. PWN2D	41 (S)	33 (S)	30 (S)	30 (S)	31 (S)	30 (S)	26 (S)	35 (S)	—	—	<i>B. amyloliquefaciens</i> WVN2D
<i>Bacillus</i> sp. DLA64	42 (S)	41 (S)	30 (S)	32 (S)	27 (S)	30 (S)	26 (S)	38 (S)	—	—	—
<i>Bacillus</i> sp. SE15	35 (S)	35 (S)	35 (S)	30 (S)	30 (S)	26 (S)	25 (S)	35 (S)	—	—	<i>B. subtilis</i> SE15
<i>Bacillus</i> sp. SE21	40 (S)	40 (S)	35 (S)	36 (S)	25 (S)	22 (R)	30 (S)	26 (S)	—	—	<i>B. safensis</i> SE21
<i>Bacillus</i> sp. SE171	29 (R)	24 (R)	35 (S)	37 (S)	26 (S)	15 (R)	30 (S)	30 (S)	—	—	<i>B. subtilis</i> SE171
<i>Bacillus</i> sp. SE192	29 (R)	25 (S)	33 (S)	33 (S)	25 (S)	30 (S)	25 (S)	26 (S)	—	—	<i>B. safensis</i> SE192
<i>B. cereus</i> HSA01	26 (R)	26 (S)	23 (R)	24 (R)	20 (R)	19 (S)	27 (S)	21 (R)	<i>B. cereus</i> HSA01		
<i>B. cereus</i> HSA03	25 (R)	31 (S)	23 (R)	22 (R)	20 (R)	18 (S)	26 (S)	21 (R)	<i>B. cereus</i> HSA03		
<i>B. cereus</i> HSA12	26 (R)	26 (S)	23 (R)	21 (R)	19 (S)	30 (S)	30 (S)	21 (R)	<i>B. cereus</i> HSA12		
<i>B. subtilis</i> HSA06	33 (S)	34 (S)	31 (S)	29 (S)	28 (S)	30 (S)	22 (S)	27 (S)	<i>B. subtilis</i> HSA06		
<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09	38 (S)	38 (S)	33 (S)	30 (S)	28 (S)	33 (S)	24 (S)	27 (S)	<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09		

Примечание. S — чувствительный штамм; R — резистентный; «—» — данное исследование не выполняли (EUCAST) [11].
 Note. S — sensitive strain; R — resistant; «—» — the study was not performed (EUCAST) [11].

тибиотику линезолиду показали устойчивость три штамма из больничной лаборатории — HSA01, HSA03, HSA12 (см. табл. 1).

Полногеномное секвенирование и определение наличия генов устойчивости. Проведение полногеномного секвенирования позволило прежде всего уточнить или определить систематическое положение штаммов бацилл, проявивших устойчивость к антибиотикам (см. табл. 1). Этим методом подтверждена принадлежность штаммов LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 к условно-патогенному виду *B. cereus*, установленная ранее анализом 16S рРНК и методом MALDI-TOF (табл. 2). Было осуществлено полногеномное секвенирование прежде всего условных патогенов *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12, а также некоторых других штаммов, проявивших устойчивость к имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину, эритромицину и линезолиду, с целью определения наличия генов устойчивости к перечисленным антибиотикам (см. табл. 2). Таким образом, в результате использования методов анализа гена 16S рРНК, MALDI-TOF и полногеномного секвенирования установлено, что из 13 штаммов бацилл по четыре принадлежат к видам *B. cereus* и *B. subtilis*, три — к *B. safensis* и два — к *B. amyloliquefaciens*. При этом три из четырёх штаммов *B. cereus*- HSA01, HSA03, HSA12 были выделены с поверхности оборудования больничной лаборатории (см. табл. 2).

С использованием диско-диффузионного метода показана устойчивость *B. cereus* LR2HG21, *B. safensis* HEP3B2, *B. subtilis* SE171, *B. safensis* SE192, *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA03, *B. cereus* HSA12 к бета-лактамному антибиотику имипенему, а у двух из этих штаммов — *B. cereus* LR2HG21 и *B. subtilis* SE171 ещё и к бета-лактамному антибиотику меропенему (см. табл. 1). Как известно, бета-лактамы антибиотики действуют путём ингибирования транспептидаз — ферментов, которые участвуют в биосинтезе клеточных стенок бактерий, а β-лактамазы бактерий инактивируют бета-лактамы антибиотики путём гидролиза их бета-лактамного кольца. На основе данных полногеномного секвенирования штаммов бацилл с использованием базы данных по устойчивости к антибиотикам CARD [13] установлено наличие в геномах большинства штаммов, резистентных к имипенему — *B. cereus* LR2HG21, *B. safensis* SE192, *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA03, *B. cereus* HSA12, гена *TEM-116*, кодирующего устойчивость бактерий к бета-лактамным антибиотикам (см. табл. 2). Ген *TEM-116* кодирует β-лактамазу расширенного спектра действия (БЛРС). Этот фермент обуславливает резистентность бактерий к таким бета-лактамным антибиотикам, как монобактамы, пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы

Таблица 2. Гены резистентности к антибиотикам, обнаруженные у штаммов бактерий рода *Bacillus* с использованием базы данных CARD [13]

Table 2. Antibiotic resistance genes detected in *Bacillus* strains using the CARD database [13]

Идентификация штаммов на основании полногеномного секвенирования	Ген	Кодирует действие на классы антибиотиков	Механизм действия	Ссылка
<i>B. cereus</i> LR2HG21	<i>TEM-116</i>	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация антибиотика	[13–17]
	<i>APH(3')-IIa</i>	Цефалоспорины, пенициллины	Инактивация антибиотика	[13]
	<i>VcII</i>	Цефалоспорины, пенамы	Инактивация антибиотика	[13, 18, 20]
<i>B. subtilis</i> SE15	<i>ykkD</i>	Аминогликозиды, тетрациклины, фениколовые антибиотики	Эффлюкс	[13]
	<i>ykkC</i>	Аминогликозиды, тетрациклины, фениколовые антибиотики	Эффлюкс	[13]
	<i>Blt</i>	Фторхинолоны, дезинфицирующие средства и антисептики	Эффлюкс	[13]
	<i>B. subtilis</i>	Пептидные антибиотики	Изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>mphK</i>	Макролиды	Инактивация антибиотика	[13, 17, 24–26]
	<i>tmrB</i>	Нуклеозиды	Снижение проницаемости антибиотика	[13]
	<i>aadK</i>	Аминогликозиды	Инактивация антибиотика	[13]
	<i>vmlR</i>	Линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, оксазолидинон, феникол, плевромутилин	Защита мишени действия	[13]
	<i>catA1</i>	Фениколовые антибиотики	Инактивация антибиотика	[13]
	<i>TEM-181</i>	Монобактам, цефалоспорин, пенам, пенем	Инактивация антибиотика	[13]
<i>B. subtilis</i> SE171	<i>ykkC</i>	Аминогликозиды, тетрациклины, фениколовые антибиотики	Эффлюкс	[13]
	<i>ykkD</i>	Аминогликозиды, тетрациклины, фениколовые антибиотики	Эффлюкс	[13]
	<i>Blt</i>	Фторхинолоны, дезинфицирующие средства и антисептики	Эффлюкс	
	<i>aadK</i>	Аминогликозиды	Инактивация антибиотика	
	<i>mphK</i>	Макролиды	Инактивация антибиотика	[13, 17, 24–26]
	<i>tmrB</i>	Нуклеозиды	Снижение проницаемости антибиотиков	[13]
	<i>B. subtilis</i>	Пептидные антибиотики	Изменение мишени антибиотика	[13]
	<i>mprF</i>			
	<i>vmlR</i>	Линкозамиды, стрептограмин, стрептограмин А, оксазолидинон, феникол, плевромутилин	Защита мишени действия	[13]
	<i>APH(3')-IIa</i>	Аминогликозиды	Инактивация антибиотика	[13]
<i>B. safensis</i> SE192	<i>TEM-116</i>	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация антибиотика	[13–17]
	<i>APH(3')-IIa</i>	Аминогликозидные антибиотики	Инактивация антибиотика	[13]
<i>B. cereus</i> HSA01	<i>TEM-116</i>	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация антибиотика	[13–17]
	<i>APH(3')-IIa</i>	Аминогликозидные антибиотики	Инактивация антибиотика	[13]
	<i>FosBx1</i>	Антибиотики группы производных фосфоновой кислоты	Инактивация антибиотика	[13]
	<i>VcI</i>	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация антибиотика	[13, 14, 18, 19]
	<i>VcII</i>	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация антибиотика	[13, 18, 20]
<i>B. cereus</i> HSA03	<i>FosBx1</i>	Антибиотики группы производных фосфоновой кислоты	Инактивация антибиотика	[13]
	<i>TEM-116</i>	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация антибиотика	[13–17]
	<i>APH(3')-IIa</i>	Аминогликозидные антибиотики	Инактивация антибиотика	[13]
	<i>VcI</i>	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация антибиотика	[13, 14, 18, 19]
	<i>VcII</i>	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация антибиотика	[13, 18, 20]
	<i>FosBx1</i>	Антибиотики группы производных фосфоновой кислоты	Инактивация антибиотика	[13]
<i>B. cereus</i> HSA12	<i>TEM-116</i>	Монобактамы, цефалоспорины, пенамы, пенемы	Инактивация антибиотика	[13–17]
	<i>APH(3')-IIa</i>	Аминогликозидные антибиотики	Инактивация антибиотика	[13]
	<i>VcI</i>	Цефалоспорины, пенемы	Инактивация антибиотика	[13, 14, 18, 19]

путём их гидролиза. При выявлении продуцентов БЛРС препаратами выбора обычно служат бета-лактамы группы карбапенемов — имипенем и меропенем. Ранее считали, что ген *TEM-116* встречается преимущественно у грамотрицательных бактерий, расположен на плазидах, и может передаваться путём конъюгации между грамотрицательными видами бактерий [14, 15]. Однако ген *TEM-116* обнаружен и у многих грамположительных бактерий, в том числе у некоторых видов *Bacillus* — *B. subtilis*, *B. simplex*, *B. thuringiensis*, *B. velezensis* [13, 16, 17]. Важно отметить, что у бацилл ген *TEM-116* может присутствовать на хромосоме или на мобильных элементах плазидах, поэтому способен передаваться с помощью плазмид не только от штамма к штамму, но, вероятно, и через видовой барьер от вида к виду [16, 17].

У *B. cereus* HSA01 и *B. cereus* HSA03, выделенных из больничной лаборатории и проявивших устойчивость к бета-лактаму имипенему (см. табл. 1) с помощью полногеномного секвенирования выявлено наличие генов *BcI* и *BcII* (см. табл. 2). У штамма *B. cereus* LR2HG21, резистентного к имипенему и меропенему, секвенирование показало наличие только гена *BcII* (см. табл. 2). Ген *BcI* кодирует сериновую β -лактамазу I *B. cereus* класса A группы 2A по классификации K. Bush и G. A. Jacoby [14, 18], гидролизующую ряд пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов у *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. halotolerans*, *B. subtilis*, *B. tequilensis*, *B. thuringiensis*, *B. velezensis* [13]. Роль β -лактамазы I в гидролизе пенициллинов и цефалоспоринов была впервые изучена у *B. cereus* 569/H/9 [19]. Ген *BcII* *B. cereus* кодирует β -лактамазу II, которая представляет собой термостабильный маннансвязывающий лектин [18], расщепляющий большое количество пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов у *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* [13]. Впервые β -лактамаза II изучена у *Bacillus cereus* 5/B/6. Она представляет собой металлобета-лактамазу цинка [20].

Фторхинолоны, которые содержат атом фтора в своей химической структуре, эффективны как против грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Одним из наиболее широко используемых антибиотиков из этой группы во всём мире является цiproфлоксацин [21]. Резистентность к фторхинолонам (хинолоны 3-го поколения) цiproфлоксацину, левофлоксацину и норфлоксацину обнаружена у всех штаммов *B. cereus* — LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 (см. табл. 1). Однако генов устойчивости к этим антибиотикам у перечисленных штаммов методом полногеномного секвенирования в базе данных CARD обнаружить не удалось (см. табл. 2). Для объяснения резистентности к фторхинолонам следует рассмотреть механизм действия этих

антибиотиков на клетки бацилл [21]. Мишенью действия фторхинолонов у грамположительных бактерий являются два фермента из группы топоизомераз — топоизомераза II (ДНК-гираза) и топоизомераза IV. Эти ферменты обладают способностью увеличивать или уменьшать степень раскручивания ДНК, что важно для таких процессов, как репликация ДНК, сегрегация хромосом, транскрипция и рекомбинация. Ингибирование функции топоизомераз приводит к гибели бактериальной клетки (бактерицидный эффект) в результате конформационных изменений в молекуле бактериальной ДНК и нарушения её нормальной репликации [21, 22]. Основным механизмом резистентности к фторхинолонам у грамположительных бактерий связан с мутациями в генах *gyrA* и *parC*, кодирующих GyrA и ParC субъединицы ферментов (quinolone-resistance-determining region) ДНК-гиразы и топоизомеразы, соответственно [21, 22]. При этом, чем больше мутаций присутствует в этих двух генах, тем выше уровень устойчивости к фторхинолонам. Резистентность бактерий к фторхинолонам развивается относительно медленно. Одиночные мутации возникают с частотой 10^{-7} – 10^{-11} . При отсутствии контакта препарата с микробной клеткой спонтанные мутанты нередко вновь становятся чувствительными. Другой механизм резистентности бактерий к фторхинолонам связан с нарушением процесса проникновения антибиотика в клетку через пориновые каналы. Кроме этого, резистентность может быть связана также с активацией эффлюксных белков, которые выводят фторхинолоны из клетки [23]. При развитии резистентности в результате нарушения транспорта препарата в клетки через пориновые каналы или при активном его оттоке из клетки в результате эффлюкса, устойчивость может носить перекрёстный характер с другими антибиотиками — бета-лактамами, аминогликозидами и другими, для которых подобные процессы также имеют важное значение [23].

У *B. subtilis* SE15, *B. safensis* SE21 и *B. subtilis* SE171, выделенных из РС МКС, обнаружена резистентность к эритромицину (см. табл.1). Действие эритромицина заключается в связывании с 23S рРНК 50S субъединицы рибосомы, что нарушает образование пептидных связей между молекулами аминокислот и блокирует синтез бактериальных белков. Известно несколько механизмов устойчивости бактерий к эритромицину. Это снижение внутриклеточной концентрации антибиотика за счёт действия эффлюксных насосов, модификация рибосом в результате метилирования 23S рРНК метилтрансферазами семейства Erm, мутации в 23S рРНК, защита рибосом в результате связывания с ними АТФ-связывающих кассетных белков MsrE, фермента-

тивно катализируемая модификация антибиотика макролид-фосфотрансферазами (Mphs) и макролид-эстеразами (Eres), метилирование 23S рРНК Egm-метилтрансферазами [24]. В результате полногеномного секвенирования трёх штаммов бацилл, показавших устойчивость к эритромицину (см. табл. 1), у двух из них — *B. subtilis* SE15 и *B. subtilis* SE171 обнаружен ген *mphK*, кодирующий хромосомную макролид-фосфотрансферазу у *B. subtilis* [13, 25]. Ген *mphK* является гомологом кодируемых хромосомами макролид-фосфотрансфераз (Mphs), которые инактивируют 14- и 15-членные макролиды — эритромицин, кларитромицин, азитромицин у *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. anthracis* [26]. Ферменты Mphs инактивируют макролид путём его модификации фосфорилированием 2'-ОН незаменимого диметиламинсахара, что предотвращает связывание антибиотика с рибосомой. У *B. subtilis* ген *mphK* находится в хромосоме [17].

У *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA03, *B. cereus* HSA12, выделенных из больничной лаборатории, обнаружена резистентность к линезолиду (см. табл. 1), используемому для лечения некоторых бактериальных инфекций у людей, таких как стрептококковая инфекция и MRSA. Линезолид обладает бактериостатической активностью за счёт ингибирования синтеза бактериальных белков в результате его связывания с 23S рРНК 50S субъединицы рибосомы. Это предотвращает формирование комплекса инициации, состоящего из субъединиц рибосом и N-формилметионин тРНК, что прерывает процесс трансляции и синтеза белка [21]. При этом полногеномное секвенирование резистентных к линезолиду штаммов бактерий (см. табл. 1, 2) не показало наличия гена устойчивости к этому антибиотику, которым является ген *cfr*. Этот ген получил своё название ввиду того, что его наличие приводит к развитию устойчивости к хлорамфениколу и флорфениколу (*cfr* — chloramphenicol-florfenicol resistance). Кроме устойчивости к хлорамфениколу и флорфениколу, штаммы-носители этого гена также устойчивы к линкозамидам (клиндамицину и линкомицину) и линезолиду. Ген *cfr* кодирует РНК-метилтрансферазу, в результате функционирования которой происходит синтез фермента метилазы, модифицирующего бактериальную рибосому и в результате препятствующему связыванию с ней линезолида, что приводит к возникновению устойчивости [27, 28]. Гены *cfr* обнаружены у многих клинических изолятов, устойчивых к линезолиду. Однако известно, что резистентность к данному антибиотику может обеспечиваться не одним, а несколькими механизмами. К устойчивости к линезолиду у *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12 могли привести мутации в генах 23S рРНК [29] и мутации в генах *rplC*, *rplD*,

кодирующих рибосомальные белки [30]. У грамположительных *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* механизм устойчивости к линезолиду обеспечивается наличием плазмидного гена *optrA*, кодирующего транспортную эффлюксную систему ABC, способную выводить из микробной клетки оксазолидиноны, к которым относится и линезолид [31].

В табл. 2 включены также гены резистентности, обнаруженные у исследованных видов бацилл в комплексной базе данных по устойчивости к антибиотикам CARD [13] и кодирующие устойчивость к препаратам, не использовавшимся в данном исследовании. Наличие этих генов подтверждает наличие у этих штаммов бацилл МЛУ.

Обсуждение результатов

Результаты исследований показали, что на РС МКС и в больничной лаборатории выявлены 13 штаммов рода *Bacillus*, принадлежащих к 4 видам — *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. safensis*, *B. amyloliquefaciens*. Вероятно, штаммы этих видов обладают наибольшей устойчивостью к средствам борьбы с ними как в условиях РС МКС, так и больничной лаборатории, с учётом того, что на РС МКС, в отличие от лаборатории, не применяется УФ-облучение и аэрозольные антисептики [4]. При этом как в РС МКС, так и в лаборатории выявлены штаммы *B. cereus*, являющегося наиболее опасным для человека, за исключением *B. anthracis*, видом бацилл, формирующим особую группу, включающую *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* и *B. anthracis* и вызывающим такие заболевания, как пищевые отравления, диарея, эндокардит, менингит, сепсис и другие формы генерализованной бактериальной инфекции, часто связанные с использованием внутрисосудистых катетеров и инъекций [5, 6, 32]. Исследование 41 штамма *B. cereus*, выделенного в цехах сборки четырёх предстартовых космических аппаратов, показало наличие в их геномах четырёх генов энтеротоксинов *hlyB*, *cytK*, *nheA* и *entFM* и двух генов рвотного токсина *ces* и *CER* [33]. Диарейная патогенность обнаружена у 90,2% (37 из 41) штаммов *B. cereus*, которые имели один или более генов энтеротоксина. При этом 32, 7, 85 и 42% штаммов содержали гены энтеротоксинов *hlyB*, *cytK*, *nheA* и *entFM*, соответственно, в хромосомной или плазмидной ДНК. Ген рвотного токсина *ces* был обнаружен в плазмидной ДНК около 8% штаммов *B. cereus*, выделенных из предстартовых космических аппаратов [33].

Полученные данные показали, что штаммы бактерий рода *Bacillus* могут обладать МЛУ — резистентностью к нескольким структурно и функционально не родственными антибиотикам

(см. табл. 1). При этом устойчивость к антибиотикам, определённым перечнем EUCAST 2023 для *B. cereus*, *B. subtilis* и других видов может обеспечиваться одним или несколькими механизмами, действующими одновременно, поэтому выявить преобладающий механизм резистентности бывает сложно [1, 22, 23]. Так, набор возможных механизмов устойчивости *B. cereus* к эритромицину включает действие эффлюксных насосов, модификацию рибосом в результате метилирования 23S рРНК метилтрансферазами семейства Erm, мутации в 23S рРНК, защиту рибосом в результате связывания с ними АТФ-связывающих кассетных белков MsrE, ферментативно катализируемую модификацию антибиотика макролид-фосфотрансферазами (Mphs) и макролид-эстеразами (Eges), метилирование 23S рРНК Erm-метилтрансферазами [24]. В результате полногеномного секвенирования трёх штаммов *B. cereus*, показавших устойчивость к эритромицину (см. табл. 1), у двух из них — *B. subtilis* SE15 и *B. subtilis* SE171 обнаружен ген *mphK*, кодирующий хромосомную макролид-фосфотрансферазу у *B. subtilis* [25, 13]. Однако у этих штаммов SE15 и SE171 не исключено действие и других, из перечисленных выше механизмов резистентности к эритромицину. Набор механизмов устойчивости к антибиотикам у *B. cereus* может увеличиваться в результате горизонтального переноса генов, как это может быть в случае с геном *TEM-116*, кодирующим β -лактамазу расширенного спектра действия [16, 17] или генами *BclI* и *BclII*, обеспечивающими резистентность к имипенему и меропенему [34, 35], которые могут находиться не только в бактериальной хромосоме, но и в плазмидах и передаваться другим штаммам.

Однако, кроме перечисленных механизмов устойчивости к различным антибиотикам, необходимо учитывать и мутации генов, которые часто являются основным механизмом резистентности к фторхинолонам, линезолиду и другим антибиотикам у грамположительных бактерий [21–23, 29, 30]. Мутации (аминокислотные замены, делеции, инсерции) происходят в генах, кодирующих мишени действия антибиотиков, белки системы эффлюкса, пориновых каналов [21–23, 31].

Считают, что космические штаммы приобретают в космосе повышенную устойчивость к антибиотикам в результате воздействия микрогравитации, космического излучения, высушивания [3, 5]. В частности, условия космического полёта могут повысить устойчивость *B. cereus* к антибиотикам [32]. Эти изменения клинических свойств бактерий в течение полёта могут создать проблемы при выборе антибиотиков для лечения заболеваний, вызванных *B. cereus* и некоторыми другими видами *B. cereus*. Но и больничная лаборатория для отбора крови также способствует появлению резистентных бактерий, поскольку через неё посто-

янно проходит поток пациентов, в том числе часто подвергающихся бесконтрольному лечению антибиотиками и поэтому способствующих появлению устойчивых форм [1, 2]. Результаты исследований показали (см. табл. 1), что все 4 штамма *B. cereus* проявили резистентность к имипенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, норфлоксацину, а больничные *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12 ещё и к линезолиду (см. табл. 1). Полногеномное секвенирование позволило выявить ген *TEM-116*, обуславливающий резистентность к имипенему и меропенему как у космических штаммов *B. cereus* LR2HG21 и *B. safensis* SE192, так и у больничных штаммов *B. cereus* HSA01, HSA03, SA12 (см. табл. 2). Все земные штаммы *B. cereus* HSA01, HSA03, HSA12, в отличие от космического *B. cereus* LR2HG21, обладают устойчивостью к линезолиду, а космические *B. subtilis* SE15, *B. subtilis* SE171 и *B. safensis* SE21 резистентностью к эритромицину (см. табл. 1). Однако определить конкретные условия, способствующие появлению у штамма бактерий резистентности к определённому антибиотику, очень трудно, поскольку механизмы появления устойчивости зависят от многих факторов — морфологических и физиолого-биохимических особенностей штамма, физико-химических условий его пребывания в окружающей среде, наличия и концентрации в среде других бактерий с определёнными свойствами, концентрации и длительности воздействия на него антисептиков, антибиотиков, УФ-облучения, космического излучения и других факторов, в том числе антропогенного.

Заключение

Исследовали 13 штаммов спорообразующих бактерий, из которых восемь получены с поверхностей оборудования РС МКС и пять из больничной лаборатории для отбора проб крови. Изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств этих бактерий позволило отнести все штаммы к роду *Bacillus*. Методами анализа гена 16S рРНК, MALDI-TOF и полногеномного секвенирования установлено, что из 13 штаммов *B. cereus* по четыре принадлежат к видам *B. cereus* и *B. subtilis*, три — к *B. safensis* и два — к *B. amyloliquefaciens*. При этом три из четырёх штаммов *B. cereus* были выделены с поверхности оборудования больничной лаборатории. В соответствии с требованиями и нормами EUCAST 2023 изучена устойчивость выделенных *B. cereus* к таким антибиотикам, как имипенем, меропенем, ципрофлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, ванкомицин, эритромицин, клиндамицин и линезолид. У семи штаммов из 13 обнаружена резистентность к имипенему, а у каждого из *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 — к имипенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину и норфлоксацину. Кроме того, у *B. cereus*

HSA01, HSA03, HSA12 из больничной лаборатории выявлена устойчивость к линезолиду. К эритромицину проявили устойчивость только *B. subtilis* SE15, *B. subtilis* SE21 и SE171, выделенные с РС МКС. Ни один из 13 штаммов не показал резистентности к ванкомицину и клиндамицину. Анализ полного генома штаммов бактерий, у которых была обнаружена устойчивость к имипенему и меропенему, показал, что резистентность к этим антибиотикам у *B. cereus* LR2HG21, HSA01, HSA03, HSA12 и *B. safensis* SE192 обеспечивает ген *TEM-116*. Кроме *TEM-116*, у *B. cereus* LR2HG21 устойчивость к имипенему и меропенему кодирует ген *BcII*, а у *B. cereus* HSA01 и *B. cereus* HSA03 резистентность к имипенему обеспечивают гены *BcI* и/или *BcII*. Резистентность к эритромицину у *B. subtilis* SE15 и *B. subtilis* SE171 кодирует ген *mphK*.

Результаты исследования показывают, что особой проблемой как на МКС, так в условиях больничной лаборатории является возможность распространения резистентности к антибиотикам путём горизонтального переноса генов [1, 16, 17]. Поэтому изучение у бацилл резистентности к антибиотикам, а также механизмов, генетических де-

терминант и возможностей распространения резистентности в микробиоме асептических помещений является актуальной задачей, направленной на обеспечение выбора адекватных методик лечения заболеваний, вызываемых бактериями рода *Bacillus*. Это особенно важно в условиях МКС, где медицинская помощь ограничена.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование осуществлялось в рамках научного проекта по выполнению государственного задания МГУ №23-1-21 (регистрационный номер ЦИТИС 121032300094-7) без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Еникеев Р. Р. — выполнение методик, получение данных для анализа, интерпретация результатов, написание текста, редактирование; Захарчук Л. М. — постановка проблемы, анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

- Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 119–146. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.
- Freedberg D.E., Salmasian H., Cohen B., Abrams J.A., Larson E.L. Receipt of antibiotics in hospitalized patients and risk for *Clostridium difficile* infection in subsequent patients who occupy the same bed. *JAMA Intern Med.* 2016; 176 (12): 1801–1808. doi: 10.1001/jamainternmed.2016.6193.
- Quagliariello A., Cirigliano A., Rinaldi T. Bacilli in the International Space Station. *Microorganisms.* 2022; 10 (12): 2309. doi: org/10.3390/microorganisms10122309.
- Novikova N., De Boever P., Poddubko S., Deshevaya E., Polikarpov N., Rakova N., Coninx I., Mergeay M. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Res Microbiol.* 2006; 157 (1): 5–12. doi: 10.1016/j.resmic.2005.07.010.
- Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiol Spectr.* 2019; 7 (3): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
- Furuta Y., Tsujinouchi M., Shawa M., Zorig T., Miyajima Y., Paudel A. et al. Complete genome sequences of 24 strains of *Bacillus cereus* isolated from nosocomial infection and bacteremia cases in Japan. *Microbiol Resour Announc.* 2022; 11 (4): e0120321. doi: 10.1128/mra.01203-21.
- Yenikeyev R., Tatarinova N., Zakharchuk L. Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics of bacterial strains of the genus *Bacillus* isolated from samples from the International Space Station. *Moscow University Biological Sciences Bulletin.* 2020; 75: 224–230. doi: https://doi.org/10.3103/S0096392520040045.
- Yenikeyev R., Tatarinova N., Zakharchuk L., Vinogradova E. Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics in *Bacillus* strains isolated from samples obtained from a medical institution. *Moscow University Biological Sciences Bulletin.* 2022; 77: 84–91. doi: https://doi.org/10.3103/S009639252202002X.
- De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B., editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd ed. Vol. 3, The Firmicutes. New York: Springer; 2009; 1450.
- Hrabák J., Chudácková E., Walková R. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26 (1): 103–114. doi: 10.1128/CMR.00058-12.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. Available from: <http://www.eucast.org>.
- Wood D.E., Salzberg S.L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 2014; 15: R46. doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r46.
- Alcock B.P., Huynh W., Chalil R., Smith K.W., Raphenya A.R., Wlodarski M.A. et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistance prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* 2023; 51 (D1): D690–D699. doi: 10.1093/nar/gkac920
- Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54 (3): 969–976. doi: 10.1128/AAC.01009-09.
- Tóth A.G., Csabai I., Judge M.F., Maróti G., Becsei Á., Spisák S. et al. Mobile antimicrobial resistance genes in probiotics. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10 (11): 1287. Published 2021 Oct 21. doi: 10.3390/antibiotics10111287.
- Berbers B., Satyukova A., Garcia-Graells C., Philipp P., Arella F., Marchal K. et al. Combining short and long read sequencing to characterize antimicrobial resistance genes on plasmids applied to an unauthorized genetically modified *Bacillus*. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 4310. Published 2020 Mar 9. doi: 10.1038/s41598-020-61158-0.
- Sultan L., Ali A., Gogry E.A., Rather I.A., Sabir J.S.M., Haq Q.M.R. Bacterial isolates harboring antibiotics and heavy-metal resistance genes co-existing with mobile genetic elements in natural aquatic water bodies. *Saudi J Biol Sci.* 2020; 27 (10): 2660–2668. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.06.002.
- Torkar K.G., Bedenić B. Antimicrobial susceptibility and characterization of metallo-β-lactamases, extended-spectrum β-lactamases, and carbapenemases of *Bacillus cereus* isolates. *Microb Pathog.* 2018; 118: 140–145. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.026.
- Davies R.B., Abraham E.P. Separation, purification and properties of beta-lactamase I and beta-lactamase II from *Bacillus cereus* 569/H/9. *Biochem J.* 1974; 143 (1): 115–127. doi: 10.1042/bj1430115.
- Lim H.M., Pène J.J., Shaw R.W. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. *J Bacteriol.* 1988; 170 (6): 2873–2878. doi: 10.1128/jb.170.6.2873-2878.1988.
- Wilson D.N., Schluenzen F., Harms J.M., Starosta A.L., Connell S.R., Fucini P. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105 (36): 13339–13344. doi: 10.1073/pnas.0804276105.
- Hooper D.C. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2001; 32 Suppl 1: S9–S15. doi: 10.1086/319370.
- Xia L.N., Li L., Wu C.M., Liu Y.Q., Tao X.Q., Dai L. et al. A survey of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes from *Escherichia coli* isolates and their dissemination in Shandong, China. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7 (2): 207–215. doi: 10.1089/fpd.2009.0378.

24. Golkar T., Zieliński M., Berghuis A.M. Look and outlook on enzyme-mediated macrolide resistance. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1942. Published 2018 Aug 20. doi: 10.3389/fmicb.2018.01942.
25. Paulowski A.C., Stogios P.J., Koteva K., Skarina T., Evdokimova E., Savchenko A. et al. The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nat Commun.* 2018; 9 (1): 112. Published 2018 Jan 9. doi: 10.1038/s41467-017-02680-0.
26. Wang C., Sui Z., Leclercq S.O., Zhang G., Zhao M., Chen W. et al. Functional characterization and phylogenetic analysis of acquired and intrinsic macrolide phosphotransferases in the *Bacillus cereus* group. *Environ Microbiol.* 2015; 17 (5): 1560–1573. doi: 10.1111/1462-2920.12578.
27. Silva-Del Toro S.L., Greenwood-Quaintance K.E., Patel R. *In vitro* activity of tedizolid against linezolid-resistant staphylococci and enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016; 85 (1): 102–104. doi: 10.1016/j.diag-microbio.2016.02.008.
28. Зубарева В.Д., Соколова О.В., Безбородова Н.А., Шкуратова И.А., Кривоногова А.С., Бытов М.В. Молекулярные механизмы и генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам у микроорганизмов. *Сельскохозяйственная биология.* 2022; 57 (2): 237–256. doi: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.2.237rus>. [Zubareva V.D., Sokolova O.V., Bezborodova N.A., Shkuratova I.A., Krivonogova A.S., Bytov M.V. Molecular mechanisms and genetic determinants of resistance to antibacterial drugs in microorganisms (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2022; 57 (2): 237–256. doi: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.2.237rus>. (in Russian)]
29. Tsiodras S., Gold H.S., Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Wennersten C., Venkataraman L. et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2001; 358 (9277): 207–208. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05410-1.
30. Pournaras S., Ntokou E., Zarkotou O., Ranellou K., Themeli-Digalaki K., Stathopoulos C. et al. Linezolid dependence in *Staphylococcus epidermidis* bloodstream isolates. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19 (1): 129–132. doi: 10.3201/eid1901.111527.
31. Wang Y., Lv Y., Cai J., Schwarz S., Cui L., Hu Z. et al. A novel gene, *optr A*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70 (8): 2182–2190. doi: 10.1093/jac/dkv116.
32. Madrigal P., Singh N.K., Wood J.M., Gaudio E., Hernández-Del-Olmo F., Mason C.E. et al. Machine learning algorithm to characterize antimicrobial resistance associated with the International Space Station surface microbiome. *Microbiome.* 2022; 10 (1): 134. Published 2022 Aug 24. doi: 10.1186/s40168-022-01332-w.
33. Mohammadi B., Gorkina N., Pérez-Reyes M.E., Smith S.A. Profiling toxin genes and antibiotic resistance in *Bacillus cereus* isolated from pre-launch spacecraft. *Front Microbiol.* 2023; 14: 1231726. Published 2023 Nov 15. doi: 10.3389/fmicb.2023.1231726.
34. Jorgensen J.H., McElmeel M.L., Fulcher L.C., Zimmer B.L. Detection of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) by testing with MicroScan overnight and ESBL confirmation panels. *J Clin Microbiol.* 2010; 48 (1): 120–123. doi: 10.1128/JCM.01507-09.
35. Meini M.R., Llarrull L.I., Vila A.J. Overcoming differences: the catalytic mechanism of metallo- β -lactamases. *FEBS Lett.* 2015; 589 (22): 3419–3432. doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.015.

Поступила / Received 29.01.2024

Принята в печать / Accepted 20.02.2024

Информация об авторах

Еникеев Радмир Рустамович — кафедра микробиологии, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-8467-9051

Захарчук Леонид Михайлович — д. б. н., доцент кафедры микробиологии, биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3783-3279

About the authors

Radmir R. Yenikeev — Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-8467-9051

Leonid M. Zakharchuk — D. Sc. in Biology, Associate Professor of the Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3783-3279

Характеристика чувствительности штаммов вируса Западного Нила 2 генотипа к противовирусным препаратам

*Е. А. ГУСЕВ¹, А. Д. РОМАНОВСКАЯ¹, А. Ю. ГАЛКИНА¹,
Д. Н. ЛУЧИНИН¹, Е. В. МОЛЧАНОВА^{1,2}

¹ ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, *Волгоград, Россия*

² ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, *Волгоград, Россия*

Резюме

Введение. Ежегодные исследования вируса Западного Нила (ВЗН), циркулирующего на эндемичных территориях, необходимы для характеристики его свойств и отслеживания их в динамике. Учитывая отсутствие специфической противовирусной терапии при лихорадке Западного Нила (ЛЗН), представляет интерес изучение чувствительности к лекарственным препаратам, широко используемым в современной практике. **Цель исследования** — изучение чувствительности штаммов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории РФ в 2018–2021 гг., к препаратам, используемым для лечения вирусных инфекций. **Материал и методы.** Чувствительность штаммов ВЗН определяли к препаратам рибавирин, риамиловир, умифеновир с использованием культуры клеток Vero. **Результаты и обсуждение.** Изучение чувствительности штаммов ВЗН, циркулировавших на территории РФ в 2018–2021 гг., к терапевтическим препаратам, используемым для лечения вирусных инфекций, показало их гетерогенность по этому признаку. Так, 5 штаммов (WNV_Volgograd_601/18, Volgograd_723/18, Volgograd_830/18, Voronezh_794/21, Astrachan_962/21) из 10 исследуемых характеризовались некоторыми отличиями в устойчивости к рибавирину и риамиловиру. При сравнении показателей устойчивости к препаратам группы штаммов ВЗН «старого» геноварианта с таковыми группы «нового» — статистически значимых различий не выявлено. **Заключение.** Дальнейший анализ генома исследуемых штаммов ВЗН позволит установить генетические особенности, что, возможно, внесёт вклад в установление молекулярных механизмов устойчивости к рибавирину, риамиловиру, умифеновиру.

Ключевые слова: вирус Западного Нила; лихорадка Западного Нила; штаммы; противовирусные средства

Для цитирования: Гусев Е. А., Романовская А. Д., Галкина А. Ю., Лучинин Д. Н., Молчанова Е. В. Характеристика чувствительности штаммов вируса Западного Нила 2 генотипа к противовирусным препаратам. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (3–4): 14–20. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-14-20>. EDN: CTVWQD.

Sensitivity Characteristics of Genotype 2 West Nile Virus Strains to Anti-Viral Drugs

*EVGENII A. GUSEV¹, ARINA D. ROMANOVSKAYA¹, ANASTASIYA YU. GALKINA¹,
DMITRY N. LUCHININ¹, ELENA V. MOLCHANOVA^{1,2}

¹ Volgograd Antiplague Scientific Research Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, *Volgograd, Russia*

² Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, *Volgograd, Russia*

Abstract

Background. Annual studies of West Nile virus (WNV) circulating in endemic areas are necessary to characterize its properties and track them over time. Given the lack of specific antiviral therapy for West Nile fever (WNF), it is of interest to study sensitivity to drugs widely used in modern practice. **The aim of the study** is to study the sensitivity of West Nile virus strains circulating in the Russian Federation in 2018–2021 to drugs used to treat viral infections. **Material and methods.** The sensitivity of WNV strains to ribavirin, riamilovir, and umifenovir was determined using Vero cell culture. **Results and discussion.** A study of the sensitivity of WNV strains circulating in the Russian Federation in 2018–2021 to therapeutic drugs used to treat viral infections showed their heterogeneity in this regard. Thus, 5 strains (WNV_Volgograd_601/18, Volgograd_723/18, Volgograd_830/18, Voronezh_794/21, Astrachan_962/21) out of 10 studied were char-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: evggusev92@gmail.com



*Correspondence to:
E-mail: evggusev92@gmail.com



EDN: CTVWQD

acterized by some differences in resistance to ribavirin and riamilovir. No statistically significant differences were revealed when comparing drug resistance indicators of the group of WNV strains of the «old» genovariant with those of the «new» group. **Conclusion.** Further analysis of the genome of the studied WNV strains will allow us to establish genetic characteristics, which may contribute to the establishment of molecular mechanisms of resistance to ribavirin, riamilovir, and umifenovir.

Keywords: West Nile virus; West Nile fever; strains; antivirals

For citation: Gusev E.A., Romanovskaya A. D., Galkina A. Yu., Luchinin D. N., Molchanova E. V. Sensitivity characteristics of genotype 2 West Nile virus strains to anti-viral drugs. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (3–4): 14–20. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-14-20>. EDN: CTVWQD.

Введение

Вирус Западного Нила (ВЗН) относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*, антигенному комплексу японского энцефалита, поддерживается в энзоотическом цикле передачи между орнитофильными комарами и птицами и является возбудителем лихорадки Западного Нила (ЛЗН) [1].

С момента своего открытия в 1937 г. ВЗН распространился за пределы своего первоначального географического ареала на все континенты, кроме Антарктиды. Первые случаи нейроинвазивной формы ЛЗН были зарегистрированы среди пожилых людей в Израиле в 1957 г. [2]. Начиная с середины 1990-х гг., количество больных в мире с тяжёлыми формами болезни постепенно увеличивалось. Вспышки менингоэнцефалитических форм ЛЗН были установлены в Бухаресте (Румыния) в 1996 г., в Волгограде (Россия) в 1999 г. и Израиле в 2000 г. [3, 4]. В 2022 г. в странах Европейского союза зарегистрирован 1201 случай ЛЗН, в США — 1035 случаев (из них 79 летальных, общая доля нейроинвазивных форм составила 71%), в Российской Федерации — 33 случая (15% — нейроинвазивные формы) [5].

Наиболее часто упоминаемые факторы риска для развития заболевания в тяжёлой форме — пожилой возраст, подавление иммунитета и хронические заболевания, включая гипертонию, диабет и хроническую почечную недостаточность [6]. В исследовании M. S. Nolan и соавт. [7] отмечено, что в ряде случаев нейроинвазивная форма ЛЗН может сопровождаться развитием хронической болезни почек. Основную часть людей, обратившихся в медицинские учреждения за специализированной помощью, составляют пациенты с нейроинвазивной формой ЛЗН, пожилые и дети — группы, особенно нуждающиеся в этиотропном лечении.

В настоящее время в России отсутствуют клинические рекомендации для лечения лихорадки Западного Нила, однако существует нормативный документ, регламентирующий тактику терапии детей с вирусными энцефалитами — «Федеральные клинические рекомендации (протоколы) по диагностике и лечению вирусных энцефалитов у детей», в котором показано использование рибавирина в дозировке 10 мг/кг/сут [8]. Специфические препараты для терапии пациентов с ЛЗН не

разработаны. Поэтому для лечения пациентов с ЛЗН применяется симптоматическая терапия и, как правило, популярные препараты, зарекомендовавшие себя как противовирусные средства в отношении возбудителей других инфекций. Согласно данным литературы, риамиловир и умифеновир являются эффективными препаратами при терапии COVID-19, гриппа, острых респираторных инфекций, гепатитов В и С, болезни, вызванной вирусом Эбола, лихорадки Ласса, везикулярного стоматита и полиомиелита [9–11]. Рибавирин обладал противовирусным действием в отношении РНК- и ДНК-вирусов *in vitro*, включая вирусы гепатита С, денге, жёлтой лихорадки, японского энцефалита и лихорадки Ласса [12, 13]. В связи с этим данные препараты были взяты в исследование в качестве средств, снижающих вирусную концентрацию.

Согласно выполненным ранее исследованиям, проведённым сотрудниками Референс-центра по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, на основании молекулярно-генетической характеристики и филогенетического анализа полногеномных последовательностей изолятов ВЗН было установлено, что все штаммы, выделенные на территории РФ в 2018–2021 гг., принадлежат ко 2-му генотипу возбудителя. При этом штаммы 2018 г. относились к так называемому «волгоградскому» варианту ВЗН, циркулирующему на территории Волгоградской области с 2007 г., и составляли отдельный геновариант («старый» геновариант). Штаммы ВЗН, выделенные в 2021 г., относились к ранее не отмечаемому на территории региона геноварианту ВЗН второго генотипа и представляли обособленную группу («новый» геновариант) [5]. В предыдущих работах нами было выявлено увеличение сроков манифестации заболевания и снижение смертности лабораторных животных при их заражении штаммами «нового» геноварианта, выделенными в 2021 г., по сравнению со штаммами, выделенными в 2018 г. [14]. Представляло интерес изучение и других свойств, а именно чувствительности к лекарственным препаратам, широко используемым в современной практике.

Таблица 1. Штаммы ВЗН, используемые в работе

Table 1. WNV strains used in this work

Наименование штамма	Дата выделения	Источник выделения, вид комаров	Место отлова, субъект РФ
Volgograd_601/18	17.10.2018 г.	<i>Culex modestus</i>	Волгоградская область
Volgograd_723/18	20.10.2018 г.	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область
Volgograd_774/18	20.10.2018 г.	<i>Culex spp</i>	Волгоградская область
Volgograd_829/18	20.10.2018 г.	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область
Volgograd_830/18	20.10.2018 г.	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область
Volgograd_843/21	27.07.2021 г.	<i>Culex pipiens</i>	Волгоградская область
Dagestan_751/21	05.08.2021 г.	<i>Culex pipiens</i>	Республика Дагестан
Voronezh_794/21	11.08.2021 г.	<i>Culex pipiens</i>	Воронежская область
Urjupinsk_825/21	11.08.2021 г.	<i>Anopheles maculipennis</i>	Волгоградская область
Astrachan_962/21	17.08.2021 г.	<i>Culex modestus</i>	Астраханская область

Цель работы — изучение чувствительности штаммов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории РФ в 2018–2021 гг., к препаратам, используемым для лечения вирусных инфекций — к рибавирину, риамиллову, умифеновиру.

Материал и методы

Штаммы ВЗН, используемые в работе. В работе использовали штаммы ВЗН 2-го генотипа, относящиеся к «старому» и «новому» геновариантам, данные представлены в табл. 1.

Препараты, используемые в работе. Для определения чувствительности штаммов ВЗН к противовирусным препаратам использовали рибавирин, риамилловир, умифеновир, применяемые для лечения вирусных инфекций (табл. 2).

Культивирование клеточных линий. Для выращивания монослоя культуры клеток Vero использовали среду DMEM («БиолоТ») с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich) и 1% антибиотика/антимикотика (Sigma-Aldrich) при 37°C, 5,5% CO₂ и 70% влажности.

Определение чувствительности штаммов ВЗН к препаратам. При определении чувствительности штаммов ВЗН к химиотерапевтическим препаратам был применён методический подход из Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [18]. В работе использовали 48-луночные культуральные планшеты. В каждую лунку планшета вносили по 150 мкл вирусосодержащей суспензии в различной концентрации (от 10⁻¹ до 10⁻⁷), затем вносили по 150 мкл поддерживающей среды (DMEM + 2% FBS + 1% антибиотик), содержащей исследуемые вещества с десятикратным разведением, в конечных концентрациях 100 мМ, 10 мМ, 1 мМ, 0,1 мМ, 0,01 мМ, 0,001 мМ. Концентрацию вируса определяли с использованием контрольных 48-луночных планшетов. Через 96 ч оценивали цитотоксические и противовирусные свойства вещества по степени подавления цитопатического действия (ЦПД).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel 2010. Вычисляли средние арифметические значения, ошибки средних величин, дисперсии и доверительные интервалы, использовали *t*-test при уровне значимости *p* ≤ 0,05.

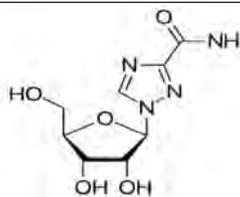
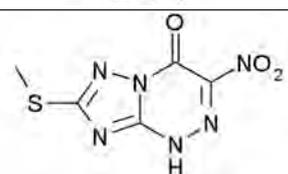
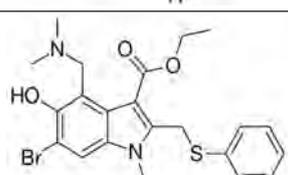
Результаты исследования

Так как при лечении больных терапевтическая концентрация препаратов в крови согласно инструкции по применению составляет 0,01–0,021 мМ, этот диапазон отмечен на рисунках квадратной рамкой [15, 16].

Рибавирин. В результате исследования было установлено, что все штаммы ВЗН обладали чувствительностью к 1 мМ и 10 мМ рибавирин. Рибавирин снижал титр инфекционных вирусных

Таблица 2. Химиотерапевтические препараты, используемые в исследовании

Table 2. Chemotherapy drugs used in the study

Препарат	Химическая структура	Краткое описание
Рибавирин (торговое название — Рибавирин®)		Производное пуринового нуклеозида гуанозина, противовирусный препарат, конкурентный ингибитор инозинмонофосфатдегидрогеназы, РНК-полимеразы вируса гриппа и гуанилил-трансферазы информационной РНК. Снижает количество внутриклеточного гуанозин трифосфата, а также подавляет синтез вирусной РНК и белка [15].
Риамилловир (торговое название — Триазавирин®)		Синтетический аналог пуринового нуклеозида (гуанозина) с выраженным противовирусным действием. Обладает широким спектром противовирусной активности в отношении РНК-содержащих вирусов. Ингибитор синтеза вирусных РНК и репликации геномных фрагментов [16].
Умифеновир (торговое название — Арбидол®)		Производное азотсодержащего гетероциклического соединения, противовирусный препарат, препятствует слиянию липидной оболочки вируса и клеточных мембран. Оказывает умеренное иммуномодулирующее действие [17].

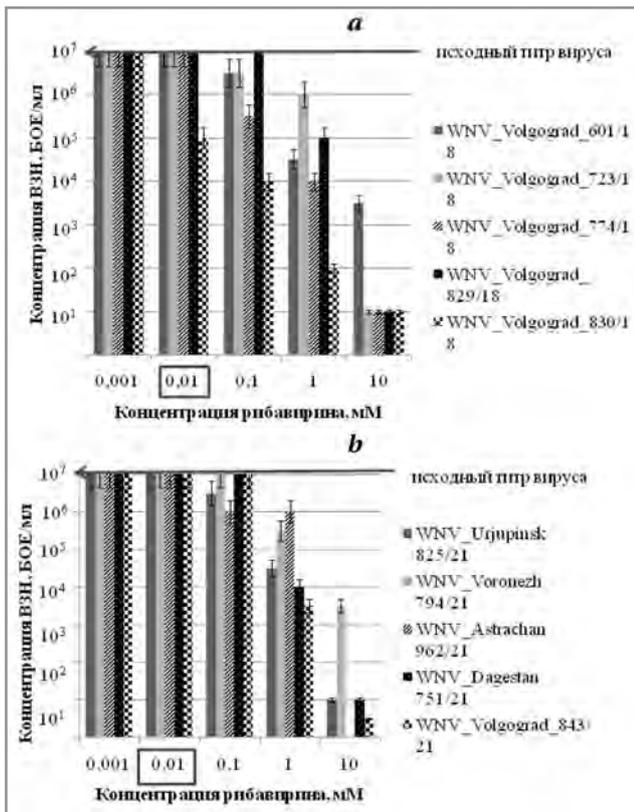


Рис. 1. Снижение концентрации вирусных частиц для штаммов ВЗН «старого» и «нового» геновариантов в присутствии рибавирина.

Fig. 1. Decrease in the concentration of viral particles for WNV strains of the «old» and «new» genovariants in the presence of ribavirin.

частиц исследуемых штаммов ВЗН на 1–6 порядков (1–6 lg). На рис. 1 представлена корреляция титра ВЗН разных геновариантов с концентрацией лекарственного средства.

Было отмечено, что три штамма отличались от остальных по анализируемому свойству. Так, штамм WNV_Volgograd_830/18 характеризовался наибольшей чувствительностью к рибавирину и снижал титр инфекционных частиц на два порядка при добавлении в среду препарата в концентрации 0,01 мМ. Штаммы WNV_Volgograd_601/18 и WNV_Voronezh_794/21 обладали некоторой устойчивостью к рибавирину по сравнению с остальными штаммами, так как титр вируса этих штаммов составлял 3,5 lg даже при нахождении в среде препарата в концентрации 10 мМ.

На рис. 2 показаны средние значения титра вирусных частиц различных штаммов, которые наблюдались при добавлении в среду рибавирина. В целом статистически значимых различий между данными показателями для штаммов ВЗН «старого» и «нового» геновариантов при дозировках препарата в минимальной и максимальной концентрациях (0,001 и 10 мМ) не выявлено, что предполагает отсутствие изменений в этом свойстве у патогена, циркулировавшего на террито-

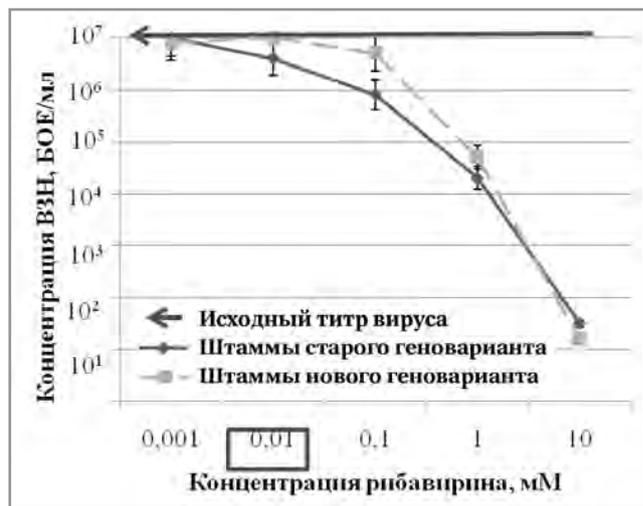


Рис. 2. Тренды средних значений концентрации вирусных частиц штаммов ВЗН «старого» и «нового» геновариантов в присутствии рибавирина.

Fig. 2. Trends in the average concentrations of viral particles of WNV strains of the «old» and «new» genovariants in the presence of ribavirin.

рии РФ с 2018 по 2021 гг. (см. рис. 2). Однако при нахождении в среде 0,1 мМ рибавирина штаммы «нового» геноварианта оказались более устойчивыми по сравнению со штаммами, принадлежащими «старому» варианту.

Риамиловир. При изучении чувствительности штаммов ВЗН к риамиловиру была обнаружена их устойчивость к препарату. Исследуемые штаммы снижали свой титр не более, чем на один порядок при добавлении в среду любой концентрации риамиловира (рис. 3). Стоит отметить, что некоторой чувствительностью обладали штаммы WNV_Volgograd_601/18 и WNV_Voronezh_794/21, титр вируса которых снизился на один порядок при концентрации препарата 0,01 мМ, равной создаваемой в крови при терапии. Наоборот, штаммы WNV_Volgograd_723/18 и WNV_Astrachan_962/21 не снижали изначальной концентрации (10⁷ БОЕ/мл) при добавлении в среду риамиловира даже в максимальной дозировке.

При сравнении средних значений чувствительности к риамиловиру штаммов ВЗН 2 генотипа статистически значимых различий не выявлено (рис. 4).

Умифеновир. При исследовании действия умифеновира было обнаружено, что штаммы ВЗН оказались нечувствительны к лекарственному средству в выбранных дозировках (10 мМ–0,001 мМ). Исключение составил штамм WNV_Volgograd_601/18, титр вируса которого при воздействии умифеновира снижался (рис. 5).

Обсуждение

Ежегодно проводимые мониторинговые исследования возбудителей арбовирусных инфек-

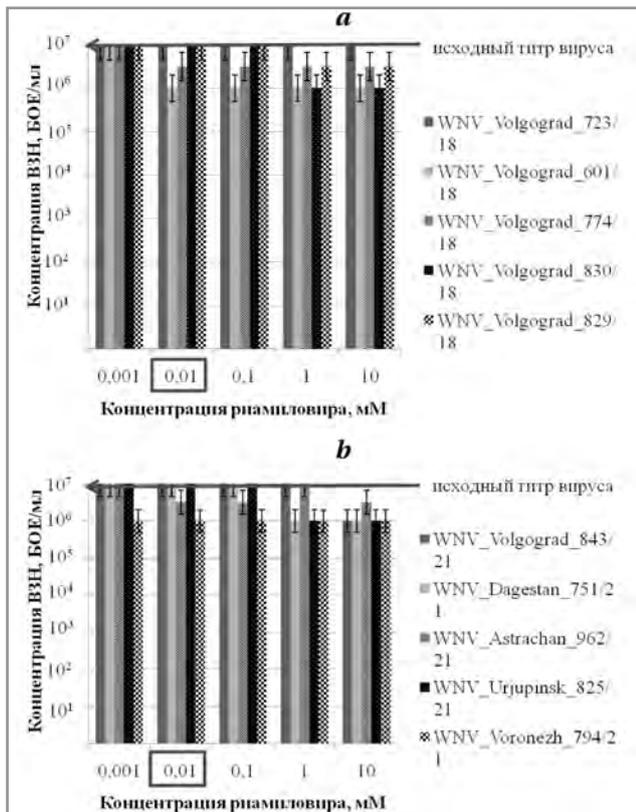


Рис. 3. Снижение концентрации вирусных частиц для штаммов ВЗН «старого» и «нового» геновариантов в присутствии риамиловира.

Fig. 3. Decrease in the concentration of viral particles for WNV strains of the «old» and «new» genovariants in the presence of riamilovir.

ций, циркулирующих на эндемичных территориях, необходимы для изучения свойств штаммов и анализа динамики этих изменений.

Изучение чувствительности штаммов вируса Западного Нила, циркулирующих на территории РФ в 2018–2021 гг., к терапевтическим препаратам, используемым для лечения вирусных инфекций, показало их гетерогенность по этому признаку. Пять штаммов (WNV_Volgograd_601/18, Volgograd_723/18, Volgograd_830/18, Voronezh_794/21, Astrachan_962/21) из десяти исследуемых характеризовались некоторыми отличиями в устойчивости к рибавирину и риамиловиру. Однако статистически значимые средние значения показателей чувствительности были установлены лишь к рибавирину в концентрациях 1 и 10 мМ, которые в 100 и 1000 раз превышали терапевтическую в плазме крови при пероральном применении препарата (5–11 мкмоль/л) [15]. Разница между чувствительной и терапевтической концентрациями препарата предположительно может указывать на низкую эффективность рибавирина при лечении ЛЗН в исследованиях других авторов [19]. Аналогичные результаты были представлены и в работе J. D. Morrey и соавт. [20], в которой рибавирин был активен в отношении

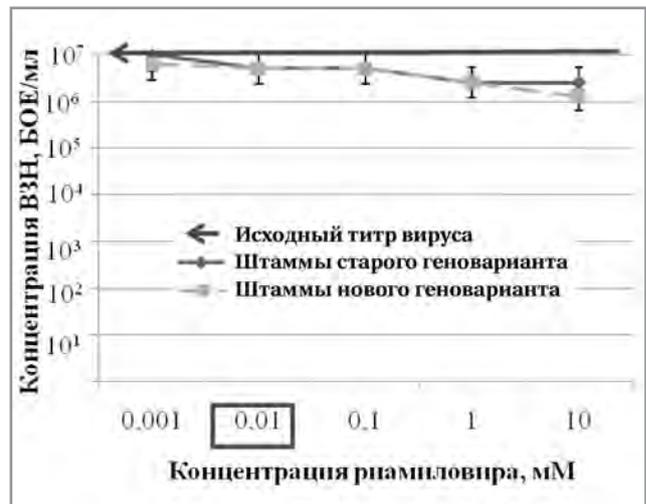


Рис. 4. Тренды средних значений концентрации вирусных частиц штаммов ВЗН «старого» и «нового» геновариантов в присутствии риамиловира.

Fig. 4. Trends in the average concentrations of viral particles of WNV strains of the «old» and «new» genovariants in the presence of riamilovir.

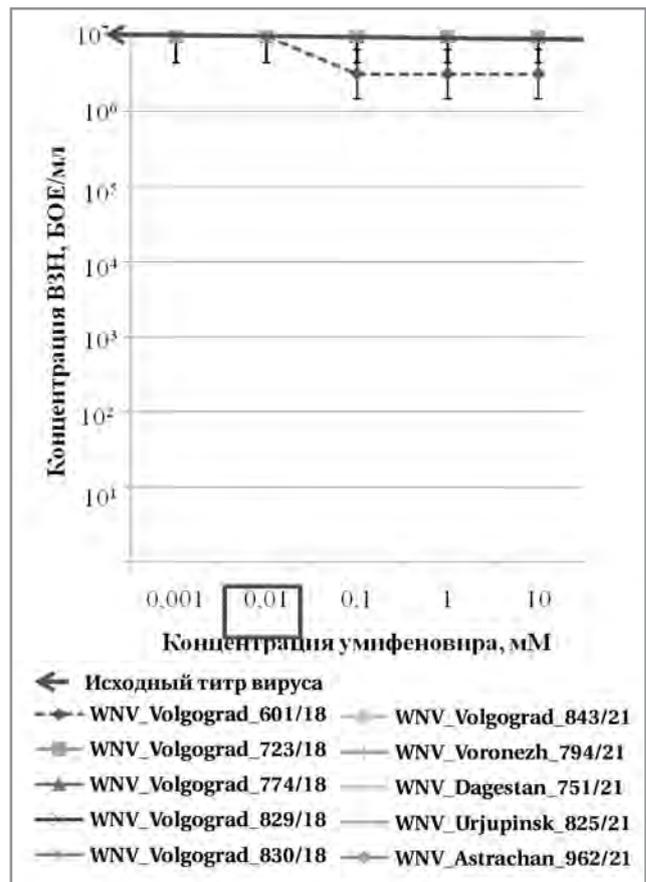


Рис. 5. Тренды средних значений концентрации вирусных частиц штаммов ВЗН «старого» и «нового» геновариантов в присутствии умифеновира.

Fig. 5. Trends in the average concentrations of viral particles of WNV strains of the «old» and «new» genovariants in the presence of umifenovir.

ВЗН *in vitro* только при очень высоких дозах и малоэффективен *in vivo*.

Рибавирин и риампиловир являются аналогами пуринового нуклеозида (гуанозина), ингибируют синтез вирусных РНК и широко используются для лечения различных вирусных заболеваний [15, 16]. Изменение чувствительности вируса к препарату может быть обусловлено мутациями. В аналогичных исследованиях, посвящённых изучению устойчивости вирусов к препаратам — аналогам нуклеозидов, в их геномах был выявлен ряд мутаций в различных генах. Так, согласно данным G. Zou и соавт. [21], замена гуанина на аденин в 6871 положении (соответствует участку РНК между NS4A и NS4B) генома ВЗН увеличивала скорость его репликации, что обеспечивало устойчивость к ликопину. В исследовании M. Qing и соавт. [22] в результате секвенирования геномов штаммов вируса денге, устойчивых к бреквину, были обнаружены мутации в генах, кодирующих капсидный белок и NS5, которые повышали эффективность сборки/высвобождения вирионов и активность вирусной полимеразы, соответственно.

Заключение

Со дня открытия возбудителя ЛЗН прошло 86 лет, однако до сих пор не разработаны специ-

фические химиотерапевтические препараты для лечения данного заболевания. Обнаружение штаммов с изменённой чувствительностью к популярным и широко применяемым противовирусным средствам необходимо как компонент мониторинговых исследований. Дальнейший анализ генома исследуемых штаммов ВЗН позволит установить генетические особенности, что, возможно, внесёт вклад в установление молекулярных механизмов устойчивости к используемым в клинической практике препаратам.

Дополнительная информация

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

Участие авторов. Е. А. Гусев — получение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста; А. Д. Романовская — анализ и интерпретация результатов; А. Ю. Галкина — анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка данных; Д. Н. Лучинин — анализ и интерпретация результатов; Е. В. Молчанова — написание текста, анализ и интерпретация результатов, редактирование, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

- <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>
- Goldblum N., Sterk V.V., Paderski B. West nile fever; the clinical features of tse disease and the isolation of west nile virus from the blood of nine human cases. *Am J Hyg.* 1954; 59(1): 89–103. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a119626.
- Platonov A. E., Shipulin G. A., Shipulina O. Y., Tyutyunnik E. N., Frolochkina T. I., Lanciotti R. S. et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(1): 128–132. doi: 10.3201/eid0701.010118.
- Weinberger M., Pitlik S. D., Gandacu D., Lang R., Nassar F., David D. B. et al. West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(4): 686–691. doi: 10.3201/eid0704.017416.
- Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Никитин Д.Н., Бородай Н.В., Батулин А.А. и др. Лихорадка Западного Нила в Российской Федерации в 2022 г., прогноз заболеваемости на 2023 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 1: 75–84. doi: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-75-84>. EDN: ZTHRXB. [Putintseva E.V., Udovichenko S.K., Nikitin D.N., Borodaj N.V., Baturin A.A. et al. Likhoradka Zapadnogo Nila v Rossijskoj Federatsii v 2022 g., prognoz zabolevaemosti na 2023 g. Problemy osobo opasnykh infektsij. 2023; 1: 75–84. doi: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-75-84>. EDN: ZTHRXB. (in Russian)]
- Chancey C., Grinev A., Volkova E., Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Res Int.* 2015; 2015. doi: 10.1155/2015/376230.
- Nolan M. S., Podoll A. S., Hause A. M., Akers K. M., Finkel K. W., Murray K.O. Prevalence of chronic kidney disease and progression of disease over time among patients enrolled in the Houston west Nile virus cohort. *PLoS ONE.* 2012; 7: 7. Article ID: e40374. doi: 10.1371/journal.pone.0040374.
- Федеральные клинические рекомендации (протоколы) по диагностике и лечению вирусных энцефалитов у детей» Утверждены на заседании профильной комиссии в рамках Всероссийского ежегодного конгресса «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» 8–9 октября 2013 года. [Federal'nye klinicheskie rekomendatsii (protokoly) po diagnostike i lecheniju virusnykh entsefalitov u detej] Uтверzhdeny na zasedanii profil'noj komissii v ramkakh Vserossijskogo ezhegodnogo kongressa «Infektsionnye bolezni u detej: diagnostika, lechenie i profilaktika» 8–9 oktyabrya 2013 goda. (in Russian)]
- Wu R., Wang L., Dina Kuo H.C., Shannar A., Peter R., Chou P.J. et al. An update on current therapeutic drugs treating COVID-19. *Current Pharmacology Reports* 2020 Jun; 6 (3): 56–70. doi: 10.1007/s40495-020-00216-7.
- Shi L., Xiong H., He J., Deng H., Zhong Q., Hou W. et al. Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackie virus and adenovirus *in vitro* and *in vivo*. *Arch Virol.* 2007; 152 (8): 1447–1455. doi: 10.1007/s00705-007-0974-5.
- Патент РФ на изобретение №2574007/ 27.01.2016. Бюл. №3. Киселев О.И., Чупахин О.Н., Русинов В.Л., Чарушин В.Н., Деева Э.Г., Уломский Е.Н. Инъекционный раствор для лечения вирусных заболеваний, выбранных из гриппа h1n1, h3n2, h5n1, клещевого энцефалита и лихорадки Западного Нила. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2574007C2/ru>. Ссылка активна на 07.09.2023. [Patent RUS №2574007/ 27.01.2016. Byul. №3. Kiselev OI, Chupakhin ON, Rusinov VL, Charushin VN, Deeva EG, Ulomskij EN. In yeksionnyy rastvor dlya lecheniya virusnykh zabolevaniy, vybrannykh iz grippa h1n1, h3n2, h5n1, kleshchevogo entsefalita i likhoradki Zapadnogo Nila. Dostupno po: <https://patents.google.com/patent/RU2574007C2/ru>. Ssylka aktivna na 07.09.2023. (in Russian)]
- Jordan I., Briese T., Fischer N., Lau J., Lipkin W. Ribavirin inhibits west nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis.* 2000; 182(40): 1214–1217. doi: 10.1086/315847.
- McCormick J. B., King I. J., Webb P. A., Scribner C. L., Craven R. B., Johnson K. M. et al. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med.* 1986; 314 (1): 20–26. doi: 10.1056/nejm19861023140104.
- Гусев Е.А., Герасимова А.Д., Мачнева А.Ю., Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В. Характеристика патогенных свойств штаммов вируса Западного Нила, выделенных на территории Европейской части России в 2018–2021 годах. Актуальные вопросы профилактической медицины и санитарно-эпидемиологического благополучия населения: факторы, технологии, управление и оценка рисков: Сборник научных трудов. Специальный выпуск: по материалам межрегиональной научно-практической конференции, Нижний Новгород, 07–08 июня 2022 года. Нижний Новгород: Медиа, 2022; 349–352. [Gusev E. A., Gerasimova A. D., Machneva A. Ju., Luchinin D. N., Molchanova E.

- V. Kharakteristika patogennykh svoystv shtammov virusa Zapadnogo Nila, vydelennykh na territorii Evropejskoj chasti Rossii v 2018–2021 godakh. Aktual'nye voprosy profilakticheskoj meditsiny i sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya: faktory, tekhnologii, upravlenie i otsenka riskov: Sbornik nauchnykh trudov. Spetsial'nyj vypusk: po materialam mezhrional'noj nauchno-prakticheskoj konferentsii, Nizhnij Novgorod, 07–08 ijunya 2022 goda. Nizhnij Novgorod: Medial', 2022; 349–352. (in Russian)]
15. <https://www.rlsnet.ru/drugs/ribavirin-18706>
 16. https://www.vidal.ru/drugs/triazavirin_43133
 17. <https://www.vidal.ru/drugs/umifenovir>
 18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012; 944. [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012; 944. (in Russian)]
 19. Иоанниди Е. А., Божко В. Г., Смелянский В. П., Божко Е. Т. Клинико-эпидемиологические аспекты и вопросы лечения лихорадки Западного Нила. Лекарственный вестник. 2015; 9 (3): 3–7. [Ioannidi E. A., Bozhko V. G., Smelyanskij V. P., Bozhko E. T. Kliniko-epidemiologicheskie aspekty i voprosy lecheniya likhoradki Zapadnogo Nila. Lekarstvennyj Vestnik. 2015; 9 (3): 3–7. (in Russian)]
 20. Morrey J.D., Smeets D.F., Sidwell R.W., Tseng C. Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus. Antiviral Res. 2002; 55: 107–116. PMID: 12076755. doi: 10.1016/s0166-3542(02)00013-x.
 21. Zou G., Puig-Basagoiti F., Zhang B., Qing M., Chen L., Pankiewicz K. W. et al. A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. Virology. 2009; 384 (1): 242–252. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.003.
 22. Qing M., Zou G., Wang Q. Y., Xu H. Y., Dong H., Yuan Z., Shi P. Y. Characterization of dengue virus resistance to brequinar in cell culture. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54 (9): 3686–3695. doi: 10.1128/aac.00561-10.

Поступила / Received 11.09.2023
 Принята в печать / Accepted 15.11.2023

Информация об авторах

Евгений Александрович Гусев — младший научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9143-7907. eLIBRARY SPIN-код: 1151737

Арина Дмитриевна Романовская — младший научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8247-6931

Анастасия Юрьевна Галкина — научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия. ORCID ID: 0000-0003-1910-3731

Дмитрий Николаевич Лучинин — научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия. ORCID ID: 0000-0001-6784-9648

Елена Владимировна Молчанова — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории арбовирусных инфекций, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия; доцент кафедры молекулярной биологии и генетики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3722-8159

About the authors

Evgenii A. Gusev — Junior researcher at the Laboratory of Arboviral Infections, Volgograd Antiplague Scientific Research Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Volgograd, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9143-7907. eLIBRARY SPIN code: 1151737

Arina D. Romanovskaya — Junior researcher at the Laboratory of Arboviral Infections, Volgograd Antiplague Scientific Research Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Volgograd, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8247-6931

Anastasiya Yu. Galkina — Researcher at the Laboratory of Arboviral Infections, Volgograd Antiplague Scientific Research Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Volgograd, Russia. ORCID ID: 0000-0003-1910-3731

Dmitry N. Luchinin — Researcher at the Laboratory of Arboviral Infections, Volgograd Antiplague Scientific Research Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Volgograd, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6784-9648

Elena V. Molchanova — Ph. D. in Biology, Senior researcher at the Laboratory of Arboviral Infections, Volgograd Antiplague Scientific Research Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; Associate Professor, Department of Molecular Biology and Genetics, Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Volgograd, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3722-8159

Сравнительный анализ противовирусной активности различных препаратов на основе 6-фтор-3-гидрокси-2-пиразинкарбоксамид (фавипиравир) в отношении возбудителя COVID-19

С. Я. ЛОГИНОВА¹, В. Н. ЩУКИНА¹, С. В. САВЕНКО¹, В. В. РУБЦОВ¹,
*С. В. БОРИСЕВИЧ¹, Д. Л. ЧИЖОВ², Г. Л. РУСИНОВ², Е. В. ВЕРБИЦКИЙ²,
В. Н. ЧАРУШИН², С. К. КОТОВСКАЯ³, В. Л. РУСИНОВ³

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

² Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

³ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Резюме

Введение. Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, унесла миллионы жизней по всему миру. В связи с этим актуальной задачей стал поиск эффективных препаратов, в том числе перепрофилирование уже существующих. Многообещающая стратегия лечения, по-видимому, заключается в нарушении препаратами репродукции вируса. РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) является центральной субъединицей процесса синтеза РНК для всех РНК-вирусов с положительной цепью и поэтому является привлекательной мишенью для противовирусных ингибиторов. **Цель работы** — экспериментальное изучение противовирусной активности различных препаратов на основе 6-фтор-3-гидрокси-2-пиразинкарбоксамид (фавипиравир) *in vitro* и *in vivo* в отношении коронавируса SARS-CoV-2 (COVID-19). **Материал и методы.** Эксперименты проводили на постоянной культуре клеток почки африканской зелёной мартышки — Vero C1008. Эффективность препаратов оценивали по подавлению репродукции вируса *in vitro*. Биологическую активность оценивали титрованием вирусосодержащей суспензии в культуре клеток Vero C1008 по формированию негативных колоний. Использовали сирийских золотистых хомячков, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант В. Эффективность препарата оценивали по коэффициенту лечебного действия. **Результаты.** Результаты исследования выявили, что соединения FP-1 и Авифавир в диапазоне концентраций 100–400 мкг/мл практически полностью подавляют репродукцию вируса SARS-CoV-2, показатель ХТИ для препарата FP-1 составил 4, Авифавира — 2. Величина ЕД₅₀ для препарата FP-1 составила 26 мкг/мл, Авифавира — 36 мкг/мл. Препараты Т-705 и Коронавир выявили противовирусную активность только в предельно высоких концентрациях. ХТИ составил 1. На сирийских золотистых хомячках, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2 вариант В в дозе 5×10⁵ БОЕ, показано, что применение Авифавира и FP-1 оказывает высокую протективную эффективность, Коронавир и Т-705 вызывает умеренное купирование размножения вируса в органе-мишени. По комплексу клинико-вирусологических, биохимических и гематологических показателей рассчитаны показатель тяжести течения заболевания (ИТЗ) и коэффициент лечебного действия (КЛД). Для препарата Авифавир ИТЗ составил 0,269; КЛД — 71,3% с вероятностью 99,9%. **Заключение.** Из изученных соединений наиболее высокую противовирусную активность выявили препараты Авифавир и FP-1.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; *in vitro*; противовирусная активность; Фавипиравир; Авифавир; FP-1; культура клеток; коэффициент лечебного действия

Для цитирования: Логинова С. Я., Щукина В. Н., Савенко С. В., Рубцов В. В., Борисевич С. В., Чижов Д. Л., Русинов Г. Л., Вербицкий Е. В., Чарушин В. Н., Котовская С. К., Русинов В. Л. Сравнительный анализ противовирусной активности различных препаратов на основе 6-фтор-3-гидрокси-2-пиразинкарбоксамид (фавипиравир) в отношении возбудителя COVID-19. *Антибиотики и химиотерапия*. 2024; 69 (3–4): 21–30. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-21-30>. EDN: ESBHYA.

Comparative Analysis of the Antiviral Activity of Various Drugs Based on 6-Fluoro-3-Hydroxy-2-Pyrazinecarboxamide (Favipiravir) Against COVID-19

SVETLANA YA. LOGINOVA¹, VERONIKA N. SCHUKINA¹, SERGEY V. SAVENKO¹,
VLADIMIR V. RUBTSOV¹, *SERGEY V. BORISEVICH¹, DMITRII L. CHIZHOV²,

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: 48cnii@mil.ru



*Correspondence to:
E-mail: 48cnii@mil.ru

EDN: ESBHYA



Abstract

Background. The COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 coronavirus, originated in Wuhan, China, has claimed millions of lives around the world. In this regard, the search for effective drugs, including the repurposing of existing ones, has become an urgent task. A promising treatment strategy appears to be drug disruption of viral reproduction. RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) is the central subunit of the RNA synthesis process for all positive-strand RNA viruses and is therefore an attractive target for antiviral inhibitors. *The aim of this work* is an experimental study of the antiviral activity of various drugs based on 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide (Favipiravir) *in vitro* and *in vivo* against the SARS-CoV-2 coronavirus (COVID-19). **Material and methods.** The experiments were carried out on a permanent culture of African green monkey kidney cells — Vero C1008. The effectiveness of the drugs was assessed by suppressing the reproduction of the virus *in vitro*. Biological activity was assessed by titration of the virus-containing suspension in Vero C1008 cell culture by the formation of negative colonies. Syrian golden hamsters orally infected with the SARS-CoV-2 virus, variant B, were used in the study. The effectiveness of the drug was assessed by the coefficient of therapeutic action. **Results.** The results of the study revealed that the compounds FP-1 and Avifavir in the concentration range of 100–400 µg/ml almost completely suppress the reproduction of the SARS-CoV-2 virus; the CTI index for the drug FP-1 was 4, for Avifavir it was 2. The ED₅₀ value for FP-1 was 26 µg/ml, for Avifavir it was 36 µg/ml. Preparations T-705 and Coronavir revealed antiviral activity only at extremely high concentrations. The CTI was 1. During the study on Syrian golden hamsters orally infected with the SARS-CoV-2 virus, variant B, at a dose of 5×10⁵ PFU, it was shown that the use of Avifavir and FP-1 has a high protective efficacy, while Coronavir and T-705 cause a moderate suppression of virus reproduction in the target organ. According to the complex of clinical-virological, biochemical, and hematological indicators, the disease severity index (DSI) and the therapeutic index (TI) were calculated. For the drug Avifavir, the DSI was 0.269; the TI was 71.3% with a probability of 99.9%. **Conclusion.** Of the studied compounds, Avifavir and FP-1 showed the highest antiviral activity.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; *in vitro*; antiviral activity; Favipiravir; Avifavir; FP-1; cell culture; therapeutic index

For citation: Loginova S. Ya., Shchukina V. N., Savenko S. V., Rubtsov V. V., Borisevich S. V., Chizhov D. L., Rusinov G. L., Verbitskiy E. V., Charushin V. N., Kotovskaya S. K., Rusinov V. L. Comparative analysis of the antiviral activity of various drugs based on 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide (favipiravir) against COVID-19. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (3–4): 21–30. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-21-30>. EDN: ESBHYA.

Введение

Стратегия лекарственной терапии вирусных инфекций направлена на использование противовирусных веществ избирательного действия, полученных в результате направленного синтеза, в том числе биотехнологическими методами, и нацеленных на блокирование одной или нескольких стадий вирусной репликации. Достижения молекулярной биологии вирусов позволили выявить общие пути направленного вмешательства в репродукцию возбудителей, найти основные мишени, на которые нацелены противовирусные вещества. Многообещающая стратегия лечения, по-видимому, заключается в нарушении препаратами репродукции вируса либо через их предполагаемый режим действия (например, ингибирование РНК-зависимой РНК-полимеразы) или за счёт их хорошо описанных нецелевых эффектов (подобно беспорядочной связи ингибиторов киназ).

РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) является центральной субъединицей процесса синтеза РНК для всех РНК-вирусов с положительной цепью и поэтому является привлекательной мишенью для противовирусных ингибиторов. В SARS-CoV-2 nsp12 функционирует как RdRp [1] и играет центральную роль в вирусной репликации

и транскрипции, катализируя синтез вирусной РНК с помощью nsp7 и nsp8, которые служат кофакторами [2]. Полимераза РНК-вирусов склонна к ошибкам репликации, в то время, как её аналог ДНК-вирусов не может считать ошибки. Эта высокая частота мутаций (от 10⁻³ до 10⁻⁵ мутаций / нуклеотид / цикл репликации) позволяет РНК-вирусам лучше адаптироваться к изменениям окружающей среды, но также вносит повреждающие мутации, которые нарушают основные функции, процесс, называемый летальным мутагенезом [3, 4]. В коронавирусах nsp14 выполняет функции как 3'-5'-экзорибонуклеазы (ЕхoN), так и гуанин-N7-метилтрансферазы (N7-МТаза). Действие на вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу оказалось успешной стратегией при лечении различных вирусных инфекций [5], но затруднено в случае CoV из-за активности ЕхoN [6, 7]. ЕхoN может гидролизовать РНК, действуя как корректирующий фермент, способный удалять несоответствующие нуклеотиды [8]. Важно отметить, что каталитический сайт RdRp имеет структурное сходство с ns5b RdRp вируса гепатита С (HCV) [9], что открывает перспективу использования противовирусных препаратов ns5b HCV в качестве терапии COVID-19. Результаты доклинического

исследования показывают, что Тенофовир и Софосбувир, два одобренных противовирусных препарата против ВГС, прочно связываются с RdRp SARS-CoV-2 [10]. Таким образом, предполагается, что поиск ингибиторов активности E_hN может стать будущим направлением для лечения COVID-19 [4]. Ряд соединений с доказанным ингибирующим действием на RdRps других вирусов были протестированы против SARS-CoV и SARS-CoV-2. Анализ данных литературы по клиническому опыту ведения пациентов с атипичной пневмонией, связанной с коронавирусами SARS-CoV и MERS-CoV позволяют предположить возможность применения для этиотропной терапии препарата Рибавирин ((1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид)), который является противовирусным средством широкого спектра. Противовирусный механизм сложен, наиболее важными эффектами являются ингибирование инозинмонофосфатдегидрогеназы клеток человека (IMPDH) монофосфатным производным препарата и включение рибавирин-5'-трифосфата в зарождающийся вирусный геном с помощью RdRp [11]. Рассматриваются подходы для лечения SARS-CoV с использованием противовирусных препаратов широкого спектра, таких как Фавипиравир и Ремдесивир [12], TMPRSS2 [13], ADAM17 [14].

Фавипиравир (Avigan™), (Т-705), (6-фтор-3-гидрокси-2-пиразинкарбоксамид), представляет собой производное пиразинкарбоксамидов и аналог гуанина, разработанное Toyama Chemical, Япония, которое избирательно и эффективно ингибирует РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) РНК-вирусов и индуцирует летальные трансверсионные мутации РНК, тем самым создавая нежизнеспособный вирусный фенотип [15–17]. Фавипиравир — это пролекарство, которое активируется фосфорилированием клеточного фермента до фавипиравир-рибофуранозил-5'-трифосфата (фавипиравир-РTP) [18]. Фавипиравир подавляет репликацию большого количества РНК-вирусов, включая вирус гриппа А, флави-, альфа-, фило-, бунья-, арена- и норовирусы, а также вирус Западного Нила, вирус жёлтой лихорадки, ящур вирус, вирус Эбола и вирус Ласса [19, 20]. Фавипиравир-РTP действует как аналог гуанозина и аденозина, его противовирусная активность значительно ингибируется пуриновыми нуклеотидами и нуклеозидами, но не пиримидиновыми нуклеотидами. Фавипиравир имеет аналогичную структуру, а также соответствующий противовирусный спектр как Рибавирин, увеличивая количество летальных мутаций в вирусном геноме; этот эффект вызывает опасения по поводу потенциального тератогенного риска [21].

В открытом неслучайном контролируемом исследовании фавипиравир показал высокие

эффекты лечения COVID-19 с точки зрения прогрессирования заболевания и вирусного клиренса. Эти результаты являются важной информацией для установления стандартных рекомендаций по лечению для борьбы с инфекцией SARS-CoV-2 [22]. Из-за тератогенности и рисков эмбриотоксичности фавипиравир был одобрен в Японии со строгими правилами для использования только в условиях эпидемий [23].

Цель работы — экспериментальное изучение противовирусной активности различных препаратов на основе 6-фтор-3-гидрокси-2-пиразинкарбоксамидов (фавипиравир) *in vitro* и *in vivo* отношении коронавируса SARS-CoV-2 (COVID-19).

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус SARS-CoV-2, вариант В, полученный в 2020 г. из ФГБУ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и хранившийся в Специализированной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

Культура клеток и среды. Эксперименты проводили на постоянной культуре клеток почки африканской зелёной мартышки — Vero C1008. В качестве ростовой и поддерживающей применяли среду Игла (MEM) на солевом растворе Хенкса, содержащую, соответственно, 7,5 и 2% фетальной телочной сыворотки.

Исследуемый препарат. FP-1 (фавипиравир), синтезированный Институтом органического синтеза им. И. Я. Постовского, УрО РАН; Т-705 (Avigan™, фавипиравир), Carbosynth Ltd, Япония; Авифавир (фавипиравир), ООО «КРОМИС» ХимРар; Коронавир (фавипиравир), АО «Р-Фарм».

Лабораторные животные. В работе были использованы сирийские золотистые хомяки (массой 50–60 г), полученные из филиала «Столбовая» (Московская обл.) ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Аклиматизация животных проходила в течение 3 дней.

Содержание и обслуживание животных осуществляли в соответствии с СП №1045 73 по содержанию, обустройству вивариев (ГОСТ Р 53434-2009) и Руководству по лабораторным животным (2010); Правилами по защите животных.

Кормление грызунов осуществлялось полноценным гранулированным комбикормом, исключающем необходимость введения дополнительных ингредиентов — «Комбикорм для содержания крыс, мышей, хомячков». ГОСТ Р 50258-92 ПК-121-10 ООО «Лабораторкорм», Москва и «Полноценный комбикорм для лабораторных животных (для разведения крыс, мышей, хомячков) ПК-120-1 847 ООО «Лабораторкорм», Москва. Перед вскармливанием корм стерилизуют автоклавированием 121°C, 1,2 АТ, 20 мин.

Животных инфицировали перорально в дозе 3×10⁵ БОЕ. За инфицированными животными наблюдение проводили в течение 6 сут, при этом контролировали уровень накопления возбудителя в лёгких в начальном периоде инфекции (1 сут), на пике инфекции (2-, 4-е сутки) и на 6-е сутки после заражения. Выделение вируса проводили в культуре клеток Vero, C1 008 по формированию негативных колоний (БОЕ).

Клинический осмотр. Отклонения от физиологической нормы.

Масса тела. После инфицирования взвешивание ежедневно.

Эвтаназия. Умерщвление методом цервикальной дислокации.

Макроскопический анализ лёгких. Макроскопическое исследование лёгких проводили при визуальном осмотре. Фиксировали следующие факторы: структура ткани, цвет, видимые повреждения и пр. Рейтинговая оценка поражения лёгких, инфицированных животных приведена в табл. 1.

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

Оценка биологических свойств возбудителя SARS-CoV-2.

Биологическую активность оценивали титрованием вирус-содержащей суспензии в культуре клеток Vero C1008 по цитопатическому действию вируса и формированию негативных колоний.

Оценка противовирусной эффективности экспериментальных субстанций осуществлена в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России [24].

Критерии оценки эффективности препарата *in vivo*.

Коэффициент лечебного действия (КЛД) рассчитывают по совокупности клинико-вирусологических показателей (снижение уровня вирусной нагрузки в органе-мишени (лёгком), не менее чем на 1,25–2,00 Ig на пике развития инфекции [17]; купирование патологоанатомических изменений в лёгких инфицированных животных; отсутствие внешних признаков заболевания в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России [17]), биохимических (активность аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, уровень креатинина, мочевины в плазме крови животных), гематологических (изменение относительного количества форменных элементов крови. Все опыты на животных были проведены в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации — ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Основным критерием оценки эффективности препаратов *in vitro* является снижение уровня накопления, Δ Ig, коэффициент ингибирования репродукции вируса (КИ, %).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка полученных результатов проведена с использова-

нием программы Microsoft Office Excel 2007. Полученные результаты представлены в виде среднего \pm ошибка репрезентативности ($\bar{x} \pm d_x$) [25].

Результаты и обсуждение

При проведении изучения противовирусной активности соединений оценивали их токсичность для культуры клеток Vero C1008 и сирийских золотистых хомяков. В процессе исследования цитотоксичности соединения изучали влияние различных концентраций препарата на морфологию клеток и острую токсичность для животных по проявлению клинических признаков интоксикации. Оценку токсичности препаратов T-705, FP-1, Коронавир и Авифавир изучали для культуры клеток Vero C1008. Навески препаратов растворяли в 50 мкл DMSO и далее до нужной концентрации средой ПС для культуры клеток. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Меньшей токсичностью для культуры клеток обладает фавипиравир (FP — 1), ФГБУН Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН.

Проведена оценка токсичности исследуемых соединений при пероральном применении в дозе 700 мг/кг (химические соединения не растворимы в водных растворителях, поэтому применяли перорально в виде суспензии в 2% растворе крахмала) в течение 6 дней, однократно. Поведение хомяков, принимавших исследуемые соединения, и интактных животных соответствовало физиологическому развитию. Гибель животных отсутство-

Таблица 1. Оценка поражения лёгких

Table 1. Assessment of lung damage

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

Таблица 2. Оценка цитотоксичности препаратов на основе 6-фтор-3-гидрокси-2-пиразинкарбоксамид (Фавипиравир) для культуры клеток Vero C1008

Table 2. Assessment of the cytotoxicity of preparations based on 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide (Favipiravir) in Vero C1008 cell culture

Препарат	Токсическая концентрация препарата, ЦПД ₅₀ , мкг/мл в опыте (№)			МПК, мкг/мл в опыте (№)			МПК, мкг/мл $\bar{x} \pm \sigma_x$
	1	2	3	1	2	3	
	FP-1	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	
T-705	≥1000	≥1000	1000	1000	1000	500	833,3±165,5
Коронавир	1000	≥1000	1000	500	1000	500	666,7±165,5
Авифавир	≥1000	≥1000	1000	1000	1000	500	833,3±165,5
Контроль среды	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	—	—	—	—
Контроль среды с 0,5% DMSO	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	—	—	—	—

Таблица 3. Оценка влияния препаратов на репродукцию вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero C1008

Table 3. Assessment of the effect of chemotherapy drugs on the reproduction of the SARS-CoV-2 virus in Vero C1008 cell culture

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	Уровень накопления вируса, Ig БОЕ/мл, $\bar{x} \pm \sigma_x$	Снижение уровня накопления вируса, Δ, \lg	Коэффициент ингибирования, КИ, %	ЕД ₅₀ , мкг/мл
FP-1 (фавипиравир)	400	3,09±0,04	3,35	99,96	26
	200	3,45±0,04	3,04	99,91	
	100	5,23±0,13	1,21	93,83	
	50	5,89±0,07	0,55	71,82	
T-705 (фавипиравир)	400	5,09±0,07	1,35	98,00	92
	200	5,89±0,07	0,55	71,82	
	100	5,95±0,06	0,49	67,64	
	50	6,01±0,06	0,43	62,85	
Авифавир	400	4,59±0,06	1,85	98,59	36
	200	5,23±0,06	1,21	93,82	
	100	5,35±0,06	1,09	91,85	
	50	5,91±0,07	0,53	70,43	
Коронавир	400	5,00±0,07	1,44	96,36	76
	200	5,50±0,06	0,94	88,51	
	100	5,93±0,07	0,51	69,05	
	50	6,15±0,06	0,29	48,73	
Контроль дозы 0,0001 БОЕ на клетку			6,44±0,09		

вала. Двигательная активность и аппетит опытной и контрольной групп не различались. Физиологической норме соответствовала упитанность, волосяной и кожный покров (волос блестящий, эластичный, хорошо удерживается в волосяной луковице). Масса тела животных, которым вводили синтезированные химические препараты на протяжении всего срока наблюдения, статистически достоверно не отличалась от такового показателя для контрольных плацебо сирийских золотистых хомяков (с вероятностью 95%).

Проведена сравнительная оценка эффективности препаратов на основе соединения 5-фтор-2-оксо-1H-пиразин-3-карбоксамид (фавипиравир) от различных производителей в культуре клеток Vero C1008 в отношении вируса SARS-CoV-2, вариант В (Ухань). Множественность инфицирования 0,0001 БОЕ на клетку, 37°C в течение 60 мин. Схема внесения препаратов — через 1 ч после инфицирования (табл. 3).

В результате проведенных исследований показано, что все изученные препараты на основе фавипиравира эффективно подавляют репродукцию вируса SARS-CoV-2 в высоких концентрациях. В более широком диапазоне концентраций высокую активность выявило экспериментальное соединение, синтезированное специалистами ФГБУН ИОС им. И. Я. Постовского УрО РАН — FP-1. В концентрации 400 мкг/мл препарат FP-1 снижал накопление вируса в клетках на 3,4 lg, 200 мкг/мл — на 3,1 lg, 100 мкг/мл — на 1,2 lg, с коэффициентами ингибирования 99,96%; 99,91% и 93,83%, соответственно. Авифавир в концентрации 400 мкг/мл снижал накопление вируса в клетках на 1,85 lg, 200 мкг/мл — на 1,21 lg, 100 мкг/мл — на 1,09 lg, с коэффициентами ингибирования 98,59%; 93,82% и 91,85%, соответственно. Величина ЕД₅₀ (расчёт по Першину) для FP-1 составила 26 мкг×мл⁻¹, T-705 — 92 мкг/мл, Авифавира — 36 мкг/мл; Коронавира — 76 мкг/мл.

Таблица 4. Результаты наблюдения изменения в лёгких при вскрытии леченных сирийских золотистых хомяков, инфицированных вирусом SARS-CoV-2

Table 4. Results of observing the lung changes during an autopsy of treated Syrian golden hamsters infected with the SARS-CoV-2 virus

Группа животных	Доза препарата, мг/кг	Поражение лёгких, $\bar{x} \pm \sigma_x$ после инфицирования, сут			
		1-е	2-е	4-е	6-е
Коронавир	700	0,0±0,0	0,3±0,6	1,0±1,0	0,3±0,6
Авифавир	700	0,0±0,0	0,6±0,2	0,6±0,2	0,2±0,2
FP-1	600	0,0±0,0	0,3±0,3	0,6±0,2	0,3±0,6
T-705	700	0,0±0,0	0,6±0,2	0,8±0,2	0,4±0,2
Контроль инфицированных животных	—	0,0±0,0	0,6±0,3	1,0±0,0	2,0±0,0

Изучение активности препаратов в отношении экспериментальной формы COVID-19 у сирийских золотистых хомяков проводили по схеме экстренной профилактики — через 1 ч после инфицирования и далее 1 раз в сутки в течение 5 дней. Препараты применяли перорально.

Сирийских золотистых хомяков перорально инфицировали вирусом SARS-CoV-2, вариант В (Ухань), в дозе 3×10^5 БОЕ в 50 мкл. Наблюдение за инфицированными животными осуществляли в течение 6 дней. Через 3 и 6 сут после инфицирования по 3 хомяка из каждой группы умерщвляли методом цервикальной дислокации.

Была проведена оценка протективной эффективности препаратов фавипиравир: FP-1, T-705, Коронавир, Авифавир по показателю подавления репродукции вируса в лёгких животных (табл. 4).

При применении Коронавира в суточной дозе 700 мг/кг через 48 ч после инфицирования у 1/3 животных выявлена слабовыраженная пневмония, у 2/3 — поражения не выявлены. У принимавших Авифавир в дозе 700 мг/кг выявлена слабовыраженная катаральная пневмония у 60% животных, у 40% — поражения не выявлены. При применении FP-1 — у 1/3 животных выявлена слабовыраженная пневмония, у 2/3 — поражения не выявлены; T-705 — выявлена слабовыраженная катаральная пневмония у 60% животных, у 40% — поражения не выявлены. В контрольной группе — у 1/3 животных — выраженная распространённая (диффузная) катаральная пневмония и у 2/3 — поражения лёгких не выявлены.

Через 4 сут у сирийских хомяков, принимавших Коронавир у 100%, наблюдали выраженную катаральную пневмонию; Авифавир — у 60% животных отмечена слабовыраженная распространённая (диффузная) катаральная пневмония, у 40% — поражения не выявлены; FP-1 — у 60% животных отмечена слабовыраженная распространённая (диффузная) катаральная пневмония, у 40% — поражения не выявлены; T-705 — у 2/3 животных наблюдали выраженную катаральную пневмонию, у 1/3 — слабовыраженную катаральную пневмонию. Наиболее выраженные, визуально наблюдаемые изменения ткани лёгких были отмечены в группе контрольных животных: отёчные, локальное поражение гра-

натового цвета, цвет неровный «мраморный», тёмно-красный.

На 6-е сутки после заражения в опытной группе животных, принимавших Авифавир, у 20% выявлена слабовыраженная распространённая катаральная пневмония и у 80% патологические изменения в ткани лёгких отсутствовали; Коронавир и FP-1 — у 1/3 животных выявлена слабовыраженная пневмония, у 2/3 — поражения не выявлены; T-705 — у 2/3 сирийских золотистых хомяков наблюдали выраженную катаральную пневмонию. В контрольной группе — лёгкие наполнены, отёчные, локальные поражения, цвет неровный «мраморный». Видимые изменения наблюдаются во всех долях.

Патологоанатомическая картина поражения лёгких у животных преимущественно характеризовалась развитием пневмонии. При применении фавипиравира на пике развития инфекции у сирийских золотистых хомяков поражение лёгких было менее выражено, чем в контрольной группе.

Проведены исследования по оценке вирусной нагрузки в органе-мишени при применении препаратов по схеме экстренной профилактики у сирийских золотистых хомяков, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 (табл. 5).

Через 48 ч у хомяков, принимавших Авифавир, вирусная нагрузка в лёгких составила 4,79 БОЕ/г, коэффициент ингибирования — 92,64%. Вирусная нагрузка в лёгких контрольной группы животных через 48 ч составила 5,92 БОЕ/г. В контрольной группе сирийских золотистых хомяков, не принимавших лекарственные препараты, наибольший уровень накопления вируса выявлен через 4 сут после инфицирования и составил 6,86 БОЕ/г. Через 96 ч снижение вирусной нагрузки в лёгких животных, принимавших Авифавир, составило 99,98%. Через 6 сут после инфицирования уровень накопления вируса в лёгких контрольной группы животных составил 4,51 lg БОЕ/г. У животных, принимавших препарат Авифавир, в терминальной фазе изучения отмечено снижение репродукции вируса SARS-CoV-2 в лёгких золотистых сирийских хомяков на 99,9%. При применении препарата Авифавир снижение репродукции вируса в ткани лёгких золотистых сирийских хомяков выявлено

Таблица 5. Результаты оценки уровня инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в лёгких сирийских хомяков при применении препаратов по схеме экстренной профилактики (n=3)

Table 5. Results of assessing the level of infectious titer of the SARS-CoV-2 virus in the lungs of Syrian hamsters when using medications according to the emergency prophylaxis scheme (n=3)

Препарат	Суточная доза, мг/кг	Параметры	Сутки после инфицирования		
			2-е	4-е	6-е
Авифавир	700	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ/г	4,79±0,02*	3,20±0,13*	1,38±0,04*
		Снижение уровня накопления	1,13	3,66	3,13
		Коэффициент ингибирования, %	92,64	99,98	99,93
Контроль дозы	—	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ/г	5,92±0,02	6,86±0,06	4,51±0,03
Т-705	700	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ/г	6,44±0,03	5,55±0,09	3,78±0,05
		Снижение уровня накопления, Δ, lg	Отсутствует	0,09	0,14
		Коэффициент ингибирования, %	0,00	19,34	26,99
Контроль дозы	—	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ/г	4,97±0,24	5,64±0,10	3,92±0,15
FP-1	600	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ/г	4,23±0,05	4,07±0,06	1,54±0,09
		Снижение уровня накопления, Δ, lg	1,81	2,20	1,96
		Коэффициент ингибирования, %	98,3	99,35	98,9
Контроль дозы	—	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ/г	6,04±0,05	6,27±0,04	3,50±0,09
		Accumulation of the virus in the lungs, lg PFU/g			
Коронавир	700	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ/г	6,44±0,03	5,55±0,09	3,78±0,05
		Снижение уровня накопления, Δ, lg	Отсутствует	0,09	0,14
		Коэффициент ингибирования, %	0,00	19,34	26,99
Контроль дозы	—	Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ/г	4,97±0,24	5,64±0,10	3,92±0,15

Примечание. * — различия достоверны с вероятностью 99% при сравнении с контролем.

Note. * — differences are significant with a probability of 99% when compared with control.

на протяжении всего срока наблюдения с вероятностью 99%.

Применение Т-705 и Коронавира практически не оказывало влияния на уровень репродукции вируса в лёгких, на пике развития заболевания в его терминальной фазе снижение вирусной нагрузки в лёгких составило 19 и 27%, соответственно.

При применении FP-1 через 48 ч вирусная нагрузка в лёгких составила 4,23 БОЕ/г, коэффициент ингибирования 98,3%. Через 96 ч — снижение вирусной нагрузки в лёгких животных, принимавших препарат, составило 99,35%. У животных, принимавших препарат FP-1, в терминальной фазе изучения выявлено снижение репродукции вируса SARS-CoV-2 в лёгких золотистых сирийских хомяков на 98,9%. Таким образом, при применении препарата, синтезированного УИОС, на протяжении всего наблюдения отмечено значительное снижение вирусной нагрузки в лёгких сирийских золотистых хомяков, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант В.

Проведён сравнительный анализ биохимических и гематологических показателей крови леченых и контрольных животных. Препарат Авифавир применяли перорально по схеме экстренной профилактики в суточной дозе 700 мг/кг. Для определения коэффициента лечебного действия провели оценку следующих показателей: вирусологические (степень поражения лёгкого, уровень вирусной нагрузки в лёгких), биохимические (активность аланин- и аспартатаминотрансферазы, креатинина, мочевины, креатинкиназы, лактатдегидрокиназы) и гематологические (уровень лейкоцитов, относительное количество лимфо-

цитов, соотношение сегменто- и палочкоядерных нейтрофилов, уровень молодых гранулоцитов).

При применении препарата Авифавир на 3-и сутки после инфицирования статистически достоверных отличий показателей крови интактных хомяков не выявлены. На 6-е и 10-е сутки после инфицирования отмечено статистически достоверное увеличение миелоцитов. По сравнению с контрольной группой животных в крови леченых животных лимфопения не выявлена и отмечен статистически более низкий уровень палочкоядерных нейтрофилов. Для инфицированных животных показатель лейкоцитарный индекс интоксикации по Кальф–Калифу (ИИ) и индекс ядерного сдвига нейтрофилов (ИЯС) на 3-и сутки после инфицирования составил 0,31; 1,63, соответственно; на 6-е сутки: ИИ — 0,29, ИЯС — 1,9; на 10-е сутки: ИИ — 0,37, ИЯС — 1,5; для интактных: ИИ — 0,18, ИЯС — 0,27. Для животных, принимавших Авифавир, на 3-и сутки после инфицирования ИИ составил 0,16; ИЯС — 0,26; на 6-е сутки: ИИ — 0,17, ИЯС — 0,25; на 10-е сутки: ИИ — 0,18, ИЯС — 0,35. Выявлено увеличение в крови количества молодых форм нейтрофилов, что говорит о ядерном сдвиге влево. Выявлен реактивный сдвиг (увеличение в крови содержания миелоцитов) на 6-е и 10-е сутки наблюдения. Появление такого сдвига не является неблагоприятным фактором течения инфекционного процесса.

Через 72 ч после инфицирования вирусная нагрузка в лёгких хомяков, принимавших фавипиравир (Авифавир), составила 3,28 lg БОЕ/г, коэффициент ингибирования — 99,4%. Вирусная нагрузка в лёгких контрольной группы животных составила 5,48 lg БОЕ/г. Через 6 сут — вирусная

Таблица 6. Результаты изучения влияния препарата Авифавир на тяжесть течения экспериментальной формы COVID-19 у сирийских золотистых хомяков, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2

Table 6. Results of studying the effect of Avifavir on the severity of the course of the experimental form of COVID-19 in Syrian golden hamsters orally infected with the SARS-CoV-2 virus

Показатель	До инфицирования	Контроль дозы инфицирования	Экстренная профилактика
Клинико-вирусологические показатели			
Накопление вируса в лёгких, lg БОЕ/г, $X_{cp} \pm \sigma_x$	—	5,48±0,07	1,85±0,10
Степень поражения лёгких, $X_{cp} \pm \sigma_x$	—	2,0±0	0,2±0,2
Биохимические показатели			
Аланинаминотрансфераза, мМ/(ч.л)	0,33±0,17	0,86±0,23	0,58±0,18
Аспартатаминотрансфераза, мМ/(ч.л)	0,48±0,09	1,10±0,12	0,73±0,24
Лактатдегидрогеназа, Е/л	207,9±101,3	532,7±283,4	485,2±120,9
Креатинкиназа, Е/л	308,19±56,53	1303,21±46,61	1056,37±1019,87
Мочевина, мМ/л	5,94±0,11	8,00±0,17	7,44±0,13
Креатинин, мкМ/л	157,1±41,2	161,9±1,4	159,8±1,9
Гематологические показатели			
Лейкоциты, 10^9 /л	2,0±0,3	1,3±0,3	1,9±0,2
Миелоциты, %	0,3±0,3	3,7±0,3	0±0
Юные нейтрофилы, %	0,0±0,0	2,3±0,3	3,0±0,6
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,3±0,3	10,7±0,3	3,0±0,6
Сегментоядерные нейтрофилы, %	19,0±0,6	9,3±0,3	16,0±0,0
Эозинофилы, %	1,0±0,6	1,7±0,3	1,0±0,0
Моноциты, %	1,0±0,0	2,0±0,0	0,7±0,3
Базофилы, %	0,7±0,8	3,0±0,0	1,3±0,3
Лимфоциты, %	75±0,6	67,0±0,0	77,3±0,3

нагрузка в лёгких составила 1,85 lg БОЕ/г, коэффициент ингибирования — 99,97%.

Применение Авифавира способствовало нормализации биохимических показателей крови сирийских золотистых хомяков (табл. 6).

По комплексу показателей рассчитан индекс тяжести заболевания (ИТЗ) сирийских золотистых хомяков при пероральном заражении вирусом SARS-CoV-2. Для инфицированных нелеченых животных ИТЗ составил 1,0. При применении препарата Авифавир ИТЗ составил 0,269, КЛД — 73,1% с вероятностью 99,9%.

Заключение

В культуре клеток Vero C1008 соединения FP-1 и Авифавир в диапазоне концентраций 100–400 мкг/мл практически полностью подавляют репродукцию вируса SARS-CoV-2, показатель ХТИ для препарата FP-1 составил 4, Авифавир — 2. Величина ED_{50} для препарата FP-1 составила 26 мкг/мл, Авифавир — 36 мкг/мл. Препараты Т-705 и Коронавир выявили противовирусную активность только в предельно высоких концентрациях, ХТИ составил 1.

Резюмируя изложенное можно заключить, что из всех изученных препаратов фавипиравира, высокую противовирусную активность выявили препарат Авифавир и экспериментальная субстанция FP-1.

Изучение терапевтической активности эффективности препаратов Авифавир, Коронавир, Т-705 и FP-1 на сирийских золотистых хомяках, перорально инфицированных вирусом SARS-CoV-2, ва-

риант В, в дозе 5×10^5 БОЕ, показало, что применение Авифавира и FP-1 оказывает высокую протективную эффективность, Коронавир и Т-705 вызывает умеренное купирование размножения вируса в органе-мишени. Патологоанатомические исследования выявили, что наиболее тяжёлые формы поражения лёгких регистрируются у сирийских хомяков, не принимавших лекарственные препараты. Патологоанатомическая картина поражения лёгких у животных преимущественно характеризовалась развитием пневмонии. Применение Авифавира способствовало нормализации биохимических и гематологических показателей крови по сравнению с нелечеными хомяками. По комплексу клинико-вирусологических, биохимических и гематологических показателей рассчитаны ИТЗ и КЛД. Для препарата Авифавир ИТЗ составил 0,269; КЛД — 71,3% с вероятностью 99,9%.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. *Логинова С. Я.* — концепция и дизайн исследования, сбор данных литературы, написание текста, сбор и обработка материала, редактирование; *Щукина В. Н.* — сбор и обработка материала, статистический анализ; *Савенко С. В.* — сбор и обработка материала; *Рубцов В. В.* — сбор и обработка материала; *Борисевич С. В.* — написание текста, редактирование; *Чижов Д. Л.* — синтез препарата; *Русинов Г. Л.* —

синтез препарата; *Вербицкий Е. В.* — синтез препарата; *Чарушин В. Л.* — редактирование; *Котовская С. К.* — сбор данных литературы; *Русинов В. Л.* — редактирование.

Funding. The study had no sponsorship.

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

Contribution. *Loginova S. Ya* — research concept and design, literature data collection, material collec-

tion and processing, text writing, text editing; *Shchukina V. N.* — material collection and processing, text writing, statistic analysis; *Savenko S. V.* — material collection and processing; *Rubtsov V. V.* — material collection and processing; *Borisevich S. V.* — text writing, text editing; *Chizhov D. L.* — drug synthesis, *Rusinov G. L.* — drug synthesis, *Verbitskiy E. V.* — drug synthesis, *Charushin V. N.* — text editing, *Kotovskaya S. K.* — literature data collection, *Rusinov V. L.* — text editing.

Литература/References

1. *Agostini M.L., Andres E.L., Sims A.C., Graham R.L., Sheahan T.P., Lu X., Smith E.C., Case J.B., Feng J.Y., Jordan R. et al.* Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease. *mBio*. 2018; 9: e00221–e18. doi: 10.1128/mBio.00221-18.
2. *Gao Y., Yan L., Huang Y., Liu F., Zhao Y., Cao L., Wang T., Sun Q., Ming Z., Zhang L. et al.* Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*. 2020 Apr 10; doi: 10.1126/science.abb7498.
3. *Smith E.C.* The not-so-infinite malleability of RNA viruses: Viral and cellular determinants of RNA virus mutation rates. *PLoS Pathog*. 2017; 13: e1006254–e1006254. doi: 10.1371/journal.ppat.1006254.
4. *Smith E.C., Blanc H., Surdel M.C., Vignuzzi M., Denison M.R.* Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: Evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003565–e1003565. doi: 10.1371/journal.ppat.1003565.
5. *De Clercq E., Li G.* DC approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin Microbiol Rev*. 2016; 29: 695–747. doi: 10.1128/CMR.00102-15.
6. *Agostini M.L., Andres E.L., Sims A.C., Graham R.L., Sheahan T.P., Lu X., Smith E.C., Case J.B., Feng J.Y., Jordan R. et al.* Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease. *mBio*. 2018; 9: e00221–e18. doi: 10.1128/mBio.00221-18.
7. *Smith E.C., Blanc H., Surdel M.C., Vignuzzi M., Denison M.R.* Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: Evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003565–e1003565. doi: 10.1371/journal.ppat.1003565.
8. *Becares M., Pascual-Iglesias A., Nogales A., Sola I., Enjuanes L., Zuñiga S.* Mutagenesis of Coronavirus nsp14 reveals its potential role in modulation of the innate immune response. *J Virol*. 2016; 90: 5399–5414. doi: 10.1128/JVI.03259-15.
9. *Gao Y., Yan L., Huang Y., Liu F., Zhao Y., Cao L., Wang T., Sun Q., Ming Z., Zhang L. et al.* Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*. 2020 Apr 10; doi: 10.1126/science.abb7498.
10. *Elfiky A.A.* Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): A molecular docking study. *Life Sci*. 2020; 253: 117592. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117592.
11. *Ferron F., Subissi L., Silveira De Moraes A.T., Le N.T.T., Sevajol M., Gluais L., Decroly E., Vornrhein C., Bricogne G., Canard B. et al.* Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115: E162–E171. doi: 10.1073/pnas.1718806115.
12. *Li G., De Clercq E.* Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat Rev Drug Discov*. 2020; 19: 149–150. doi: 10.1038/d41573-020-00016-0.
13. *Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020; 181 (2): 271–280. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
14. *Xu J., Sriramula S., Xia H., Moreno-Walton L. et al.* Clinical relevance and role of neuronal AT1 receptors in ADAM17-mediated ACE2 shedding in neurogenic hypertension. *Circ Res*. 2017; 121: 43–55. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310509.
15. *Furuta Y., Takahashi K., Fukuda Y., Kuno M., Kamiyama T., Kozaki K.* *In vitro* and *in vivo* activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46 (4): 977–981. doi: 10.1128/AAC.46.4.977-981.2002.
16. *Furuta Y., Komeno T., Nakamura T.* (T-705) Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017; 93(7): 449–463. doi: 10.2183/pjab.93.027.
17. *Jin Z., Smith L.K., Rajwanshi V.K., Kim B., Deval J.* The ambiguous base-pairing and high substrate efficiency of T-705 (favipiravir) ribofuranosyl 5'-triphosphate towards influenza A virus polymerase. *PLoS One*. 2013; 8 (7): e68347.
18. *Furuta Y., Gowen B.B., Takahashi K., Shiraki K., Smeets D.F., Barnard D.L.* Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res*. 2013; 100: 446–454. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.
19. *Delang L., Abdelnabi R., Neyts J.* Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses. *Antiviral Res*. 2018; 153: 85–94. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.03.003.
20. *Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K., Sakamoto K., Smeets D.F., Barnard D.L.* T-705 (favipiravir) and related compounds: novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res*. 2009; 82 (3): 95–102. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.02.198.
21. *Jordan P.C., Stevens S.K., Deval J.* Nucleosides for the treatment of respiratory RNA virus infections. *Antivir Chem Chemother*. 2018; 26: 2040206618764483. doi: 10.1177/2040206618764483.
22. *Cai Q., Yang M., Liu D. et al.* Experimental treatment with favipiravir for COVID-19: an open-label Control Study. *Engineering (Beijing)*. 2020; 6 (10): 1192–1198. doi: 10.1016/j.eng.2020.03.007.
23. *Nagata T., Lefor A.K., Hasegawa M., Ishii M.* Favipiravir: A new medication for the Ebola virus disease pandemic. *Disaster Med Public Health Prep*. 2015; 9: 79–81. doi: 10.1017/dmp.2014.151.
24. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, 2012. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Moscow: FGBU «NTsESMP» Minzdravotsrazvitiya Rossii, 2012. (in Russian)]
25. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз., 1962; 180. *Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A.* Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh. Leningrad: Medgiz., 1962; 180. (in Russian)]

Поступила / Received 10.03.2024

Принята в печать / Accepted 05.04.2024

Информация об авторах

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

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

Савенко Сергей Вадимович — научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России», Московская

About the authors

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

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

Sergey V. Savenko — Researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian

область, Сергиев Посад, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5175-916X

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

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

Чижов Дмитрий Леонидович — к. х. н., старший научный сотрудник, Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2877-6148

Русинов Геннадий Леонидович — к. х. н., ведущий научный сотрудник, Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8567-9435

Вербицкий Егор Владимирович — д. х. н., директор института, Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9613-8738

Чарушин Валерий Николаевич — д. х. н., заведующий лабораторией, Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-9140-358X

Котовская Светлана Константиновна — к. х. н., ведущий научный сотрудник, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-3213-9838

Русинов Владимир Леонидович — д. х. н., профессор, член-корр. РАН РФ, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1705-4078

Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5175-916X.

Vladimir V. Rubtsov — Ph. D. in Veterinary Sciences, Researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. ORCID ID: 0000-0003-4387-0367

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

Dmitrii L. Chizhov — Ph. D. in Chemistry, Senior Researcher, Postovsky Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2877-6148

Gennady L. Rusinov — Ph. D. in Chemistry, Leading Researcher, Postovsky Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8567-9435

Egor V. Verbitskiy — D. Sc. in Chemistry, Director of the Postovsky Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9613-8738

Valery N. Charushin — D. Sc. in Chemistry, Head of the Laboratory, Postovsky Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9140-358X

Svetlana K. Kotovskaya — Ph. D. in Chemistry, Leading Researcher, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N.Yeltsin, Ekaterinburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-3213-9838

Vladimir L. Rusinov — D. Sc. in Chemistry, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1705-4078

Противовирусная активность препарата Цитовир®-3 в отношении возбудителя ротавирусной инфекции человека *in vitro*

Е. Б. ФАЙЗУЛОВЕВ¹, И. А. ЛЕНЁВА¹, В. С. СМИРНОВ², Д. И. СМИРНОВА¹,
А. В. ГРАЧЕВА¹, Е. Р. КОРЧЕВАЯ¹, Д. М. ХОХЛОВА¹, *Т. А. КУДРЯВЦЕВА³,
С. В. ПЕТЛЕНКО⁴, В. А. ЗАПЛУТАНОВ⁵

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия

² ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

⁵ АННО ВО НИЦ Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Введение. Ротавирусная инфекция ежегодно вызывает более 250 млн эпизодов острых гастроэнтеритов, из которых примерно 130 000 случаев у детей в возрасте до 5 лет заканчиваются летально. В связи с этим, поиск препаратов для лечения ротавирусной инфекции представляется крайне актуальным. **Цель работы** — оценить противовирусную активность препарата «Цитовир®-3» в отношении ротавируса человека на клеточной модели инфекции. **Материал и методы.** Объектами исследования являлись смесь активных действующих веществ и отдельных компонентов, идентичных по составу и соотношению, содержащиеся в лекарственном препарате «Цитовир®-3». Исследование проводилось с использованием культуры клеток почки обезьяны MA-104 и лабораторного штамма ротавируса группы А человека — 568, генотип G3P. При выполнении работы были использованы культуральные, вирусологические, молекулярно-биологические и статистические методы. **Результаты и обсуждение.** Анализ выживаемости клеток MA-104 в присутствии препарата «Цитовир®-3» показал, что в диапазоне концентраций от 100 до 200 мкг/мл препарат воспроизводимо проявлял противовирусную активность, что выразилось в повышенной, по сравнению с вирусным контролем, выживаемости клеток. «Цитовир®-3» в нетоксичной концентрации 150 мкг/мл на всех сроках наблюдения подавлял репродукцию ротавируса на 1,0–2,0 Ig ТЦД₅₀/мл при различных схемах внесения в культуру клеток, что сопровождалось достоверным снижением концентрации вирусной РНК и цитопротекторным действием.

Ключевые слова: ротавирус; Цитовир®-3; альфа-глутамил-триптофан; аскорбиновая кислота; бендазол; противовирусная активность; цитопротекторное действие; *in vitro*

Для цитирования: Файзулов Е. Б., Ленёва И. А., Смирнов В. С., Смирнова Д. И., Грачева А. В., Корчевая Е. Р., Хохлова Д. М., Кудрявцева Т. А., Петленко С. В., Заплутанов В. А. Противовирусная активность препарата Цитовир®-3 в отношении возбудителя ротавирусной инфекции человека *in vitro*. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (3–4): 31–41. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-31-41>. EDN: ESBYBY.

Antiviral Activity of Cytovir®-3 Against Human Rotavirus Infection Agent *in vitro*

EVGENY B. FAIZULOEV¹, IRINA A. LENEVA¹, VYACHESLAV S. SMIRNOV²,
DARIA I. SMIRNOVA¹, ANASTASIIA V. GRACHEVA¹, EKATERINA R. KORCHEVAYA¹,
DARIA M. KHOKHLOVA¹, *TATYANA A. KUDRYAVTSEVA³,
SERGEY V. PETLENKO⁴, VASILIIY A. ZAPLUTANOV⁵

¹ I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

² Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia

³ Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Scientific and Clinical Center of Toxicology named after Academician S.N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

⁵ Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint-Petersburg, Russia

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: tatyana@kudryavcev.info



*Correspondence to:
E-mail: tatyana@kudryavcev.info

EDN: ESBYBY



Abstract

Introduction. Rotavirus infection causes more than 250 million episodes of acute gastroenteritis annually, of which approximately 130,000 cases in children under 5 years of age are fatal. In this regard, the search for drugs for the treatment of rotavirus infection seems extremely relevant. *The aim of the research* was to evaluate the antiviral activity of Cytovir®-3 against human rotavirus on a cellular infection model. **Material and methods.** The objects of the study were a mixture of active ingredients and individual components, identical in composition and ratio, contained in Cytovir®-3. The study was carried out using a monkey kidney cell culture MA-104 and a laboratory strain of human group A rotavirus — 568, genotype G3P. Cultural, virological, molecular biological and statistical methods were used during the study. **Results and discussion.** Analysis of the survival of MA-104 cells in the presence of Cytovir®-3 showed that in the concentration range from 100 to 200 µg/ml, the drug reproducibly exhibited antiviral activity, which was expressed in increased cell survival compared to the viral control. Cytovir®-3 in a non-toxic concentration of 150 µg/ml suppressed the reproduction of rotavirus by 1.0-2.0 lg CC₅₀/ml with various schemes of introduction into cell culture at all periods of observation, which was accompanied by a significant decrease in the concentration of viral RNA and a cytoprotective effect.

Keywords: rotavirus; Cytovir®-3; alpha-glutamyl-tryptophan; ascorbic acid; bendazole; antiviral activity; cytoprotective effect; *in vitro*

For citation: Faizulov E. B., Leneva I. A., Smirnov V. S., Smirnova D. I., Gracheva A. V., Korchevaya E. R., Khokhlova D. M., Kudryavtseva T. A., Petlenko S. V., Zaplutanov V. A. Antiviral activity of Cytovir®-3 against human rotavirus infection agent *in vitro*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (3-4): 31-41. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-31-41>. EDN: ESBYBY.

Введение

В странах с низким охватом вакцинацией против ротавирусной инфекции именно ротавирусы группы А (РВА) являются основной причиной острых гастроэнтеритов и госпитализации детей с данной нозологией в возрасте до 5 лет. Ежегодно в мире ротавирусная инфекция вызывает более 250 млн эпизодов диареи, из которых примерно 130 000 случаев у детей в возрасте до 5 лет заканчиваются летально [1].

Патогенные для человека ротавирусы относятся к виду *Rotavirus A*, рода *Rotavirus*, семейства *Sedoreoviridae*. Геном этих возбудителей представлен 11 сегментами двухцепочечной РНК, кодирующих синтез 12 белков [2]. Большинство циркулирующих РВА человека относятся к трём эволюционным линиям, которые отличаются констелляциями генома: Wa — DS-1 и AU-1-подобные штаммы [3].

В настоящее время специфические антиротавирусные препараты отсутствуют. Лечение ротавирусного энтерита проводится преимущественно симптоматическими средствами и включает комплекс мероприятий, где, помимо основных процедур по восстановлению водно-электролитного баланса и детоксикации, назначаются диета и биологические препараты на основе пробиотиков и пребиотиков для коррекции нарушений биоценоза кишечника в случаях присоединения вторичной бактериальной инфекции [4]. Потенциальные лекарственные препараты, описанные в научной литературе, являются противовирусными препаратами широкого спектра действия и не являются специфичными для ротавирусов [5]. В связи с этим, поиск препаратов для лечения ротавирусного энтерита остаётся актуальным.

Цель исследования — оценка противовирусной активности препарата «Цитовир®-3» в отно-

шении ротавируса человека на клеточной модели инфекции.

Задачи:

1. Оценка цитотоксичности препарата «Цитовир®-3» и препарата сравнения/положительного контроля Умифеновир с определением максимально переносимой концентрации (МПК) и ЦТД₅₀ в культуре клеток MA-104 *in vitro*.

2. Оценка противовирусной активности смеси действующих веществ, используемой в готовых лекарственных формах препарата «Цитовир®-3» и препарата сравнения/положительного контроля Умифеновир.

Материал и методы

При выполнении исследования были использованы методы культивирования клеток млекопитающих, оценка выживаемости клеток в тесте МТТ, титрование вируса по цитопатогенному действию (ЦПД), количественное определение ротавирусной РНК методом ОТ-ПЦР-РВ, статистические методы.

Образцы исследуемых препаратов и их приготовление. Образец смеси активных действующих веществ препарата «Цитовир®-3» — альфа-глутамил-триптофан, аскорбиновая кислота и бендазола гидрохлорида, а также отдельные компоненты этих препаратов были предоставлены АО «МБНПК «Цитомед» (Санкт-Петербург, Россия). Препаратом сравнения при оценке противовирусной активности являлась субстанция препарата Умифеновир (синтезирован в ЦХЛС-ВНИХФИ Москва, Россия).

Приготовление раствора препарата «Цитовир®-3». Сухую субстанцию препарата растворяли в стерильной воде до концентрации 10 мг/мл (сток-раствор) и далее разводили до необходимых концентраций с использованием поддерживающей среды.

Приготовление раствора препарата Умифеновир. К 5 мг субстанции Умифеновира добавляли 0,5 мл этилового спирта и оставляли при 37°C на 30 мин до полного растворения. К полученному раствору добавляли 4,5 мл дистиллированной воды. Итоговый раствор с концентрацией 1 мг/мл и далее разводили до необходимых концентраций с использованием поддерживающей среды.

Приготовление раствора аскорбиновой кислоты (АК). Сухую субстанцию препарата растворяли в стерильной воде

до концентрации 2,9 мг/мл (сток-раствор, соответствующий концентрации «Цитовир®-3» 10 мг/мл) и далее разводили до необходимых концентраций с использованием поддерживающей среды. Приготовление раствора «Цитовир®-3» без АК. Сухую субстанцию препарата, предоставленную АО «МБНПК «Цитомед» (смесь альфа-глутамил-триптофан натрия 0,5 мг и бендазола гидрохлорида 20 мг), растворяли в стерильной воде до концентрации 7,1 мг/мл (сток-раствор, соответствующий концентрации «Цитовир®-3» 10 мг/мл) и далее разводили до необходимых концентраций с использованием поддерживающей среды.

Культура клеток. Исследование выполняли на клетках почки обезьяны МА-104. Клетки культивировали при 37°C в питательной среде Игла MEM на основе буфера Эрла («ПанЭко», Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco»), 300 мкг/мл L-глутамина («ПанЭко»), 40 мкг/мл гентамицина («ПанЭко») в атмосфере с 5% CO₂.

Клетки МА-104, достигшие полного монослоя, трипсицизировали, разводили питательной средой до концентрации 100 тыс. клеток/мл и за три дня до постановки эксперимента засеивали в 12-луночные, 24-луночные или 96-луночные планшеты.

Оценка цитотоксичности препаратов в тесте МТТ с определением МПК и ЦТД₅₀ в культуре клеток МА-104. Из полученных препаратов готовили разведения для определения МПК и цитотоксической дозы 50 (ЦТД₅₀) в клетках МА-104. Для препаратов, исследуемых на наличие противовирусной активности («Цитовир®-3» и Умифеновир), при приготовлении разведений использовали поддерживающую среду с трипсином с последующей инкубацией в поддерживающей среде в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 4 суток (без смены среды). По окончании срока инкубации оценивали выживаемость клеток (проявление цитотоксичности препаратов) с использованием теста МТТ.

На 3-и сутки после внесения исследуемых образцов проводили микроскопическое исследование монослоя клеток на наличие признаков токсичности. Далее в колориметрическом тесте МТТ спектрофотометрически оценивали выживаемость клеток. В лунки 96-луночного планшета с клетками добавляли по 20 мкл раствора МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) («ПанЭко», Россия) с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч. Культуральную жидкость отбирали и добавляли в лунки по 100 мкл ДМСО («Sigma-Aldrich», кат.номер D4540-1L) в каждую лунку. С помощью планшетного спектрофотометра определяли оптическую плотность каждой лунки при 530 нм с учётом фоновых значений при 620 нм. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Выживаемость} = \frac{\text{ОП}_{530} \text{ опытной пробы}}{\text{ОП}_{530} \text{ клеточного контроля}} \times 100\%, \text{ где}$$

ОП₅₃₀ опытной пробы — среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с исследуемым препаратом; ОП₅₃₀ клеточного контроля — среднее значение оптической плотности в лунках с клеточной культурой без препарата. Далее оценивали разведение препарата, соответствующее МПК, то есть разведение, достоверно не изменяющее значение ОП по сравнению с контролем клеток. Полулетальные концентрации (ЦТД₅₀) рассчитывали с помощью онлайн-калькулятора Quest Graph™ IC₅₀ Calculator [6].

Вирус. Для проведения исследования использовали ротавирус человека, штамм 568, генотип G3P [3], полученный из Государственной коллекции вирусов (номер в ГКВ — 2288). Ротавирус выращивали в культуре клеток МА-104. Для активации к вирусному материалу добавляли трипсин до концентрации 5 мкг/мл. Инкубировали смесь 1 ч при 37°C. После активации разбавляли вирус поддерживающей средой с трипсином 2 мкг/мл. Удаляли ростовую среду из флакона и трижды промывали монослой клеток поддерживающей средой (5 мл среды на флакон). Вносили вирус при желаемой МОI, инкубировали 1 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. После инкубации с вирусом добавляли необходимый объём поддерживающей среды с трипсином. Инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C до появления ЦПД (от 3 до 5 сут). Состав поддерживающей среды: среда Игла MEM на основе буфера Эрла («ПанЭко», Россия), 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко»), 40 мкг/мл гентамицин («ПанЭко»), 2 мкг/мл трипсина («Sigma»).

Титрование вируса по цитопатогенному действию (ЦПД). Титр ротавируса определяли по конечной точке проявления ЦПД в культуре клеток МА-104. Перед началом титрования вирусный материал размораживали при комнатной температуре, проводили его активацию добавлением трипсина до конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали смесь 1 ч при 37°C. После активации, готовили последовательные десятикратные разведения вируса в поддерживающей среде с трипсином. Далее из лунок планшета удаляли ростовую среду, трёхкратно промывали монослой поддерживающей средой (чтобы избавиться от следов сыворотки) и вносили разведения вируса с последующей инкубацией в течение 4 сут в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Учёт результатов титрования проводили визуально путём микроскопического исследования клеточного монослоя на наличие характерного ЦПД на 4-е сутки после заражения (округление и открепление клеток от монослоя). Титр вируса рассчитывали, как описано в работе М. А. Ramakrishnan и соавт. [7], и выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

Количественное определение ротавирусной РНК методом обратной транскрипции (ОТ)-ПЦР-РВ. Выделение вирусной РНК из культуральной жидкости проводили набором реагентов «МагноСорб» («ООО «НекстБио», Россия), согласно инструкции производителя. Идентификацию ротавируса и количественное определение вирусной РНК проводили методом ПЦР-РВ с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ). Для выявления вирусной РНК методом ОТ-ПЦР-РВ были использованы праймеры и зонды к гену NSP3 [8] (табл. 1).

Образец в объёме 9 мкл, смешанный с праймерами RA1 и RA3, в объёме 1 мкл и с концентрацией 6 пмоль/мкл, предварительно прогревался при температуре 95°C в течение 5 мин. К полученному образцу добавляли 15 мкл реакционной смеси для обратной транскрипции, которая содержала 10 мкл «2,5x реакционной смеси для ПЦР-РВ -Taq» («Синтол», Россия), 0,6 мкл «Обратной транскриптазы MMLV» (50 ед.; «Синтол», Россия) и 4,4 мкл деионизованной воды. Обратная транскрипция ставилась по следующему температурно-временному режиму: 10 мин — 45°C, 2 мин — 95°C. К полученной ДНК добавлялось 25 мкл реакционной смеси, содержащей по 6 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда; 10 мкл реакционной смеси с Taq-полимеразой; 11 мкл воды. Температурно-временной режим: 95°C — 90 с (1 цикл); 95°C — 20 с, 59°C — 35 с (45 циклов).

Таблица 1. Последовательность праймеров и зонда для выявления РНК

Table 1. Sequence of primers and a probe for RNA detection

Праймер	Последовательность
RA1	ACC ATC TWC ACA TGA CCC TC
RA2	ACC ATC TTC ACG TAA CCC TC
RA3	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA
ROTAz	ROX -TGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAAp- RTQ-21
RaC-f	ACCATCTACACATGACCCTCTATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAAAAAC
RaC-r	GGTCACATAACGCCCTATAGCCATTTAGGTTTTTGACAGTGTTAGCTTTT

Таблица 2. Определение цитотоксичности препарата Цитовир-3 в МТТ-тесте**Table 2. Determination of the cytotoxicity of Cytovir-3 using the MTT assay**

Концентрация Цитовир-3, мкг/мл	КК	10	50	75	100	150	200	300	400	500
Выживаемость, %	100±6	77±7*	67±22*	64±11*	86±12*	61±17*	60±10*	47±6	33±8	30±3

Примечание. Здесь и в табл. 3–5: КК — клеточный контроль; * — диапазон концентраций до достижения ЦТД₅₀.
Note. Here and tables 3–5: КК — cell control; * — concentration range until CC₅₀ (50% cytotoxic concentration) is reached.

Таблица 3. Определение цитотоксичности препарата Цитовир-3 (без АК*) в МТТ-тесте**Table 3. Determination of cytotoxicity of Cytovir-3 (without AA*) in the MTT assay**

Концентрация Цитовир-3 (без АК), мкг/мл	КК	2.9	14.5	21.8	29	43.5	58	87	116	145
Выживаемость, %	100±14	79±20*	76±16*	76±17*	71±12*	79±14*	77±15*	60±17*	44±13	41±11

Примечание. АК — аскорбиновая кислота.

Note. АК — ascorbic acid (AA).

Реакцию ПЦР-РВ проводили в амплификаторе ДТ-prime-4 («ДНК-технология», Россия). Значение порогового цикла в ПЦР-РВ (ПЦ) определяли автоматически с помощью программы RealTime_PCR v.7.7 («ДНК-Технология») на основании математического анализа формы кривой амплификации (метод геометрический, Ср). Все праймеры и зонды синтезированы в ООО «Синтол» (Россия).

Для количественного определения вирусной РНК в качестве калибратора использовали разведения синтетических олигонуклеотидов RaC-f и RaC-r с известной концентрацией, соответствующих по координатам амплифицируемому фрагменту генома (см. табл. 1). Калибровочные образцы готовились следующим образом: каждый олигонуклеотид был разбавлен до разведения 10⁻⁴, после чего они были смешаны в равных объёмах. Далее готовилась реакционная смесь: 20 мкл реакционной смеси с Taq-полимеразой, 20 мкл воды и 10 мкл смеси олигонуклеотидов, и ставилась реакция при следующем температурно-временном режиме: 2 мин — 95°C; 10 мин — 55°C. Далее полученный дуплекс ДНК использовали для приготовления ряда последовательных десятикратных разведений.

Оценка противовирусной активности препаратов по выживаемости клеток. Для изучения противовирусной активности в клетках МА-104 исследуемые препараты использовали в различных разведениях. Эксперименты проводили по двум схемам применения: 1) Лечебно-профилактическая: внесение препарата за 2 ч до вирусного инфицирования; 2) Лечебная: внесение препарата одновременно с вирусным инфицированием (0 ч);

Противовирусную активность препаратов исследовали при двух дозах заражения — 100 и 20 ТЦД₅₀/лунку.

Эти разведения вносили в клетки согласно схеме эксперимента с последующей инкубацией в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 4 сут. По окончании срока инкубации оценивали проявление лечебной и лечебно-профилактической активности препаратов по выживаемости клеток с использованием теста МТТ.

Оценка противовирусной активности препаратов по репродуктивной активности вируса. «Цитовир®-3», отдельные компоненты препарата «Цитовир®-3» и препарат сравнения в наиболее эффективной концентрации вносили в лунки 12-луночного планшета по двум схемам: 1) Лечебно-профилактическая: внесение препарата за 2 ч до вирусного инфицирования; 2) Лечебная: внесение препарата одновременно с вирусным инфицированием (0 ч);

Противовирусную активность препаратов исследовали при дозе заражения 100 ТЦД₅₀/лунку. Исследуемые разведения препаратов вносили в трёх повторах в лунки 12-луночного планшета с клетками с последующей инкубацией в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 4 сут (опционально: через 3 ч проводили замену смеси препаратов с вирусом на поддерживающую среду с трипсином, содержащую препараты в исследуемых концентрациях в объёме 1 мл, и инкубировали в течение 4 сут).

Ежедневно проводили микроскопическое исследование клеток. Отбор культуральной среды проводили на 1-, 2-е и

3-и сутки после внесения смеси: по 30 мкл культуральной жидкости каждого повтора объединяли в одной пробирке для титрования вируса и по 100 мкл в 4 повторах для определения концентрации вирусной РНК методом ОТ-ПЦР-РВ. Отбранные образцы хранили при температуре минус 80°C до регистрации результатов исследования.

Статистическая методология и обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Graphpad Prism v.5.03. Достоверность разницы между оцениваемыми параметрами проводили с использованием *t*-теста при 95% доверительном интервале. Полулетальные концентрации (ЦТД₅₀ и ИК₅₀) рассчитаны с помощью онлайн-калькулятора Quest Graph™ IC₅₀ Calculator [6]. При выполнении математического анализа различия считали статистически значимыми при *p* < 0,05.

Результаты

Оценка цитотоксичности исследуемых препаратов по результатам МТТ-теста. Данные по выживаемости клеток, полученные в МТТ-тесте, хорошо согласовались с микроскопическим исследованием монослоя на 4-е сутки после внесения препарата. Результаты представлены в табл. 2.

Из полученных результатов следует, что МПК для препарата «Цитовир®-3» составила 150 мкг/мл. Данные по выживаемости клеток, полученные в МТТ-тесте, хорошо согласовались с микроскопическим исследованием монослоя на 4-е сутки после внесения препарата. Значение ЦТД₅₀ для препарата «Цитовир®-3» в культуре клеток МА-104 составило 281,5 мкг/мл.

В эксперименте были изучены следующие концентрации препарата «Цитовир®-3» без АК: 2.9, 14.5, 21.8, 29, 43.5, 58, 87, 116, 145 мкг/мл (соответствуют концентрациям «Цитовир®-3»: 10, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 мкг/мл). Результаты определения выживаемости клеток в присутствии препарата «Цитовир®-3» в МТТ-тесте представлены в табл. 3.

Полученные результаты свидетельствуют, что в повторном эксперименте МПК «Цитовир®-3» без АК составила 58 мкг/мл, что соответствует концентрации 200 мкг/мл для препарата «Цитовир®-3». Значение ЦТД₅₀ для препарата «Цитовир®-3» без АК в культуре клеток МА-104 составило 88 мкг/мл, что примерно соответствует концентрации полной

Таблица 4. Определение цитотоксичности препарата Умифеновир в МТТ-тесте

Table 4. Determination of the cytotoxicity of Umifenovir in the MTT test

Концентрация Умифеновира, мкг/мл	КК	7,5	10	12,5	15	17,5	20	25	30	50
Выживаемость, %	100±11	59±9*	58±7*	56±17*	51±17*	57±19*	62±20*	44±19	4±1	3±0

Таблица 5. Противовирусная активность препарата Цитовир-3 в отношении ротавируса группы А, штамм 568, в культуре клеток МА-104 (внесение препарата за 2 ч до вирусного инфицирования)

Table 5. Antiviral activity of Cytovir-3 against group A rotavirus, strain 568, in MA-104 cell culture (the drug was administered 2 hours prior to viral infection)

Доза вируса	Выживаемость клеток, %									
	КК	10*	50*	75*	100*	150*	200*	300*	400*	ВК
100 ТЦД ₅₀ /лунку	108±6	76±58 [#]	13±8	42±28	93±16**	116±32**	109±20**	107±26**	40±11	18±20
20 ТЦД ₅₀ /лунку		82±70 [#]	105±17 [#]	45±18	94±6**	81±17**	69±6	25±6	26±6	42±43

Примечание. Здесь и в табл. 6–9: КК — клеточный контроль; ВК — вирусный контроль; * — концентрации препарата Цитовир-3; ** — диапазон выживаемости клеток на фоне применения препарата; [#] — необъяснимо высокая выживаемость клеток.

Note. Here and tables 6–9: КК — cellular control; ВК — viral control; * — concentrations of Cytovir-3; ** — range of cell survival during the use of the drug; [#] — inexplicably high cell survival.

Таблица 6. Противовирусная активность препарата Цитовир-3 в отношении ротавируса группы А, штамм 568, в культуре клеток МА-104 (внесение одновременно с вирусным инфицированием)

Table 6. Antiviral activity of Cytovir-3 against group A rotavirus, strain 568, in MA-104 cell culture (administered simultaneously with viral infection)

Доза вируса	Выживаемость клеток, %									
	КК	10*	50*	75*	100*	150*	200*	300*	400*	ВК
100 ТЦД ₅₀ /лунку	103±8	33±34	52±33	41±25	70±29**	66±18**	60±6**	21±2	18±2	20±13

Примечание. КК — клеточный контроль; ВК — вирусный контроль; * — концентрации препарата Цитовир-3; ** — диапазон выживаемости клеток на фоне применения препарата.

Note. КК — cellular control; ВК — viral control; * — concentrations of Cytovir-3; ** — range of cell survival during the use of the drug.

композиции «Цитовир®-3» равной 300 мкг/мл. Данные по выживаемости клеток, полученные в МТТ-тесте, хорошо согласовались с микроскопическим исследованием культуры клеток на 4-е сутки после внесения препарата.

Сопоставление результатов оценки цитотоксичности полной композиции препарата и Цитовира-3 без АК показало, что основной вклад в индукцию цитотоксичности композиции, наиболее вероятно, вносит бендазола гидрохлорид, так как доклиническое изучение отдельных компонентов не показало наличия токсических свойств у α-глутамил-триптофана натрия.

Были изучены следующие концентрации препарата сравнения Умифеновир: 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 50 мкг/мл. Результаты определения выживаемости клеток в присутствии препарата Умифеновир в МТТ-тесте представлены в табл. 4.

МПК препарата Умифеновир составила примерно 20 мкг/мл. Данные по выживаемости клеток, полученные в МТТ-тесте, также согласовались с микроскопическим исследованием монослоя на 4-е сутки после внесения препарата. Точное значение ЦТД₅₀ для препарата Умифеновир в культуре клеток МА-104 составило 28,5 мкг/мл.

Оценка противовирусной активности Цитовир-3 по выживаемости клеток. Первоначально противоротавирусное действие препарата «Цитовир®-3» в культуре клеток МА-104

было изучено с использованием метода ингибирования цитопатического действия. В культуру клеток добавляли препарат «Цитовир®-3» в диапазоне концентраций, включая МПК, — 10, 50, 75, 100, 150, 200, 300 и 400 мкг/мл и на 4-е сутки, после развития ЦПД в лунках вирусного контроля эффект ингибирования оценивался количественно с помощью МТТ-теста. Препарат сравнения Умифеновир использовали в диапазоне концентраций, включая МПК, — 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 50 мкг/мл. Для заражения клеточной культуры применяли две дозы — 100 и 20 ТЦД₅₀/мл. Препараты суспендировали с двумя разными дозами вируса и вносили в культуру клеток МА-104 согласно схемам:

1. Лечебно-профилактическая: внесение препарата за 2 ч до вирусного инфицирования.
2. Лечебная: внесение препарата одновременно с вирусным инфицированием (0 ч).

Анализ выживаемости клеток в присутствии препарата «Цитовир®-3» в культуре клеток МА-104 показал, что в диапазоне концентраций от 100 до 200 мкг/мл (концентрации, сопоставимые с МПК, близкие к ЦТД₅₀) препарат воспроизводимо проявляет противовирусную активность, что выражается в повышенной в сравнении с вирусным контролем выживаемости клеток (табл. 5, 6). Наиболее выраженная защита от ЦПД проявилась при лечебно-профилактической схеме внесения препарата.

Таблица 7. Противовирусная активность препарата Цитовир-3 без АК в отношении ротавируса группы А, штамм 568, в культуре клеток МА-104 (внесение препарата за 2 ч до вирусного инфицирования)

Table 7. Antiviral activity of Cytovir-3 without AA against group A rotavirus, strain 568, in cell culture MA-104 (the drug was administered 2 hours prior to viral infection)

Доза вируса	Выживаемость клеток, %									
	КК	2,9*	14,5*	21,8*	29*	43,5*	58*	87*	116*	ВК
100 ТЦД ₅₀ /лунку	104±17	8±0	10±5	29±5	26±10	44±11	68±10**	38±7	54±20**	7±1
20 ТЦД ₅₀ /лунку		6±1	36±36	28±22	52±15**	51±10**	100±7**	48±11	55±18**	13±6

Таблица 8. Противовирусная активность препарата Цитовир-3 без АК в отношении ротавируса группы А, штамм 568, в культуре клеток МА-104 (внесение одновременно с вирусным инфицированием)

Table 8. Antiviral activity of the drug Cytovir-3 without AA against group A rotavirus, strain 568, in MA-104 cell culture (administered simultaneously with viral infection)

Доза вируса	Выживаемость клеток, %									
	КК	2,9*	14,5*	21,8*	29*	43,5*	58*	87*	116*	ВК
100 ТЦД ₅₀ /лунку	108±13	9±0	12±1	19±9	32±11	55±11**	62±3**	44±5	56±4**	12±4
20 ТЦД ₅₀ /лунку		31±24	37±37	39±19	60±7**	63±9**	61±14**	56±6***	60±6**	43±28

Таблица 9. Противовирусная активность препарата Умифеновир в отношении ротавируса группы А, штамм 568, в культуре клеток МА-104 (внесение одновременно с вирусным инфицированием)

Table 9. Antiviral activity of the drug Umifenovir against group A rotavirus, strain 568, in MA-104 cell culture (administered simultaneously with viral infection)

Доза вируса	Выживаемость клеток, %									
	КК	7,5*	10*	12,5*	15*	17,5*	20*	25*	30*	ВК
100 ТЦД ₅₀ /лунку	100±6	6±1	7±1	29±13	51±10**	42±6	41±7	37±22	9±2	17±1
20 ТЦД ₅₀ /лунку		15±3	22±7	31±8	55±2**	46±11	35±8	16±3	7±1	12±2

Концентрация полумаксимального ингибирования (ИК₅₀) «Цитовир®-3» при лечебно-профилактической схеме составила 83,06 мкг/мл при дозе заражения 100 ТЦД₅₀/лунку.

Примечательно, что повышенная выживаемость клеток проявилась также в присутствии «Цитовир®-3» без АК при дозах заражения 20 и 100 ТЦД₅₀/лунку (табл. 7, 8).

Таким образом, анализ выживаемости клеток МА-104 в присутствии препарата «Цитовир®-3» показал, что в диапазоне концентраций от 100 до 200 мкг/мл (концентрации, сопоставимые с МПК и близкие к ЦТД₅₀) препарат воспроизводимо проявляет признаки противовирусной активности, сопоставимые с препаратом сравнения (Умифеновир, табл. 9), что выражается в повышенной по сравнению с вирусным контролем выживаемости клеток. Изучение противовирусной активности «Цитовир®-3» без АК позволило обнаружить, что решающая роль в индукции противовирусных свойств комплексного препарата принадлежит двум другим компонентам «Цитовир®-3» — бендазолу и альфа-глутамил-триптофану.

Оценка противовирусной эффективности препарата Цитовир-3 по влиянию на уровень репродукции ротавируса. Была исследована способность препарата «Цитовир®-3» и его отдельных компонентов в нетоксичных концентрациях подавлять вирусную репродукцию в культуре клеток.

В лунки, содержащие монослой модельной культуры клеток, вносили композицию «Цитовир®-3», а так же её отдельные компоненты и препарат сравнения в наиболее эффективной неток-

сичной концентрации и вирусную суспензию по двум схемам: 1) Лечебно-профилактическая: внесение препарата за 2 ч до вирусного инфицирования; 2) Лечебная: внесение препарата одновременно с вирусным инфицированием (0 ч).

Первоначально противовирусную активность препаратов исследовали с использованием одной дозы заражения 100 ТЦД₅₀/лунку, поскольку в предыдущих экспериментах при данной дозе стабильно срабатывал вирусный контроль. Отбор культуральной среды проводили на 1-е, 2-е и 3-и сутки после заражения для титрования вируса и определения концентрации вирусной РНК методом ОТ-ПЦР-РВ.

В табл. 10 представлены результаты оценки вирусной репродукции в присутствии композиции «Цитовир®-3» и препарата сравнения (концентрация вирусной РНК и титр вируса) в разные периоды наблюдения.

Результаты (Опыт 1). Анализ накопления вирусной РНК выявил снижение концентрации вирусной РНК в присутствии «Цитовир®-3» и Умифеновира на 2-е и 3-и сутки наблюдения. При одновременном внесении препарата и вируса достоверные различия «Цитовир®-3» и Умифеновира с вирусным контролем по концентрации вирусной РНК появляются на 2-е ($p < 0,05$) и на 3-и сутки наблюдения ($p < 0,001$).

Выявленное в ходе исследования негативное влияние «Цитовир®-3» и Умифеновира на накопление ротавирусной РНК согласовалось с накоплением в культуральной жидкости инфекционного ротавируса (табл. 11, 12). Пониженный по сравнению с вирусным контролем уровень ви-

Таблица 10. Концентрация вирусной РНК в культуре клеток МА-104 на 1-е, 2-е и 3-и сутки в присутствии Цитовир-3 и Умифеновира при разных схемах внесения препаратов (доза заражения — 100 ТЦД₅₀/лунку)
Table 10. Concentration of viral RNA in the MA-104 cell culture on days 1, 2, and 3 in the presence of Cytovir-3 and Umifenovir with different drug administration regimens (infection dose — 100 CC₅₀/well)

Препараты	Концентрация РНК, Ig копий РНК/мл		
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки
Внесение препаратов одновременно с вирусной нагрузкой			
Цитовир-3 150 мкг/мл	7,36±6,52	8,31±7,62*	9,31±8,70**
Умифеновир 17,5 мкг/мл	7,05±6,33	8,43±7,01*	9,08±8,79**
Вирусный контроль	7,52±7,32	9,07±8,60	9,99±9,30
Клеточный контроль	<3,0	<3,0	<3,0
Внесение препаратов за 2 ч до заражения ротавирусом			
Цитовир-3 150 мкг/мл	7,42±6,65	8,40±7,99	9,37±8,74
Умифеновир 17,5 мкг/мл	7,28±6,53	8,21±8,02	9,04±9,12
Вирусный контроль	7,27±7,07	9,20±8,91	9,80±9,18
Клеточный контроль	<3,0	<3,0	<3,0

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — различия достоверны по отношению к вирусному контролю.

Note. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — differences are significant in relation to viral control.

Таблица 11. Титр вируса в культуре клеток МА-104 на 1–3-е сутки в присутствии Цитовир-3 и Умифеновира при одновременном внесении ротавируса
Table 11. Virus titer in MA-104 cell culture on days 1-3 in the presence of Cytovir-3 and Umifenovir with the simultaneous introduction of rotavirus

Препараты	Титр вируса, Ig ТЦД ₅₀ /мл		
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки
Цитовир-3 150 мкг/мл	2,17	5,5	6,5
Умифеновир 17,5 мкг/мл	2,5	4,83	8,5
Вирусный контроль	3,83	7,17	7,5
Клеточный контроль	<1,0	<1,0	<1,0

Таблица 12. Титр ротавируса в культуре клеток МА-104 на 1-е, 2-е и 3-и сутки при внесении Цитовир-3 и Умифеновира за 2 ч до заражения
Table 12. Rotavirus titer in MA-104 cell culture on days 1, 2, and 3; Cytovir-3 and Umifenovir were added 2 hours before infection

Препараты	Титр вируса, Ig ТЦД ₅₀ /мл		
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки
Цитовир-3 150 мкг/мл	2,83	6,17	6,17
Умифеновир 17,5 мкг/мл	2,5	5,5	5,5
Вирусный контроль	3,83	7,83	8,17
Клеточный контроль	<1,0	<1,0	<1,0

Таблица 13. Концентрация вирусной РНК в культуре клеток МА-104 на 1–3 сутки после внесения Цитовир-3, Цитовир-3 без АК, АК и Умифеновира при одновременном внесении ротавируса
Table 13. Concentration of viral RNA in the MA-104 cell culture on days 1-3 after the addition of Cytovir-3, Cytovir-3 without AA, AA and Umifenovir with the simultaneous addition of rotavirus

Препараты	Концентрация РНК, Ig копий РНК/мл		
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки
Цитовир-3 150 мкг/мл	4,74±4,41	6,57±6,32**	8,29±7,90
Умифеновир 17,5 мкг/мл	5,55±5,03	7,21±7,16	8,20±7,89
Цитовир-3 без АК (соотв. 150 мкг/мл Цитовир-3)	5,38±5,40	6,97±7,10*	8,22±7,26
Вирусный контроль	5,67±5,56	8,10±8,03	9,03±8,70
Клеточный контроль	<3,0	<3,0	<3,0

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$ — различия достоверны по отношению к вирусному контролю.

Note. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$ — differences are significant in relation to viral control.

русной репродукции (разница в 1,0–2,0 Ig ТЦД₅₀/мл) в присутствии «Цитовир®-3» отмечался при разных схемах эксперимента и на всех сроках наблюдения. В присутствии Умифеновира подавление вирусной репродукции проявилось на 1-е и 2-е сутки при лечебной схеме эксперимента и на всех сроках наблюдения при лечебно-профилактической схеме.

Результаты (Опыт 2). Во время выполнения второго независимого эксперимента в методику внесено изменение: введена двукратная отмывка

клеток от вируса через 3 ч после заражения. Цель изменений — минимизировать «фон» при оценке вирусной репродукции методом ПЦР-РВ. Кроме того, отмывка могла снизить реальную дозу заражения. Опыт 2 проводили только при одновременном внесении ротавируса (табл. 13, 14).

При оценке концентрации вирусной РНК в первый день, статистически значимых результатов по сравнению с вирусным контролем не наблюдалось. На второй день концентрация вирусной РНК в присутствии композиции «Цитовир®-3»

Таблица 14. Титр вируса в культуре клеток МА-104 на 1–3 сутки после внесения Цитовира-3 ГЛС, Цитовира-3 без АК, АК и Умифеновира при одновременном внесении ротавируса

Table 14. Virus titer in MA-104 cell culture on days 1-3 after the addition of Cytovir-3 FPP, Cytovir-3 without AA, AA and Umifenovir with simultaneous addition of rotavirus

Препараты	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл		
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки
Цитовир-3 150 мкг/мл	2,5	3,83	6,17
Умифеновир 17,5 мкг/мл	2,5	5,50	6,83
Цитовир-3 без АК (соотв. 150 мкг/мл Цитовир-3)	2,83	4,5	7,5
Вирусный контроль	3,83	6,17	8,17
Клеточный контроль	<1,0	<1,0	<1,0

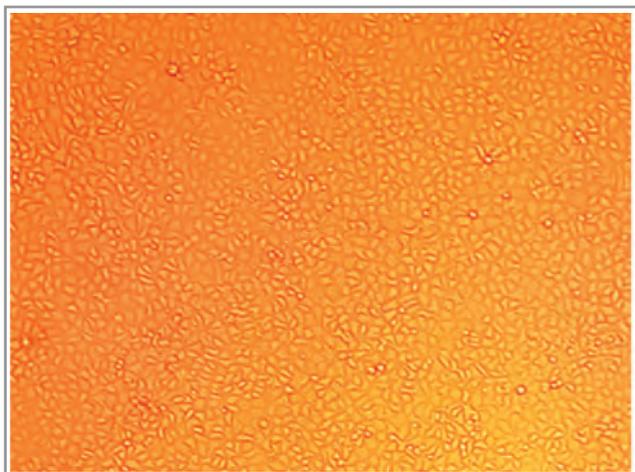


Рис. 1. Культура клеток МА-104 на 4-е сутки (клеточный контроль).

Fig. 1. MA-104 cell culture on day 4 (cell control).

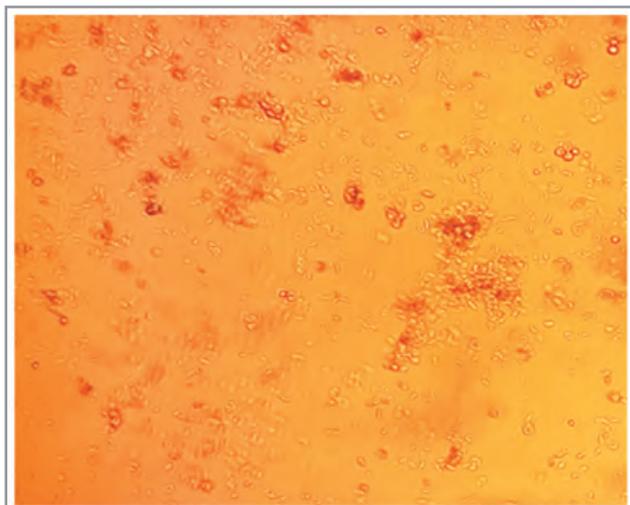


Рис. 2. Культура клеток МА-104 на 4-е сутки после заражения — вирусный контроль.

Примечание. Монослой полностью дезинтегрирован, клетки разрушены и находятся во взвешенном состоянии.

Fig. 2. MA-104 cell culture on the 4th day after infection - viral control.

Note. The monolayer is completely disintegrated, the cells are destroyed and are in a suspended state.

была достоверно ниже вирусного контроля ($p < 0,001$), так же, как и при использовании композиции «Цитовир®-3» без АК ($p < 0,05$) и только АК ($p < 0,05$). На третий день различия между препаратами и вирусным контролем вновь стали статистически незначимыми (см. табл. 14).

Пониженный по сравнению с вирусным контролем уровень вирусной репродукции (разница в 1,0–2,0 lg ТЦД₅₀/мл) в присутствии «Цитовир®-3» ГЛС и «Цитовир®-3» без АК отмечался на всех сроках наблюдения. В присутствии Умифеновира подавление вирусной репродукции проявилось, но в меньшей степени.

В клеточном контроле монослой клеток полностью сохранен, присутствуют единичные «всплывшие» клетки (рис. 1).

Противовирусная активность полной композиции «Цитовир®-3», а также «Цитовир®-3» без АК и Умифеновира проявилась и при микроскопическом изучении монослоя на 2–4-е сутки наблюдения. Наиболее выраженное ЦПД наблюдалось на 4-е сутки после заражения в лунках с вирусным контролем (рис. 2). Во всех лунках с Умифеновиром, «Цитовир®-3» без АК и «Цитовир®-3» на 2–4-е сутки наблюдалось менее выраженное ЦПД по сравнению с вирусным контролем после зараже-

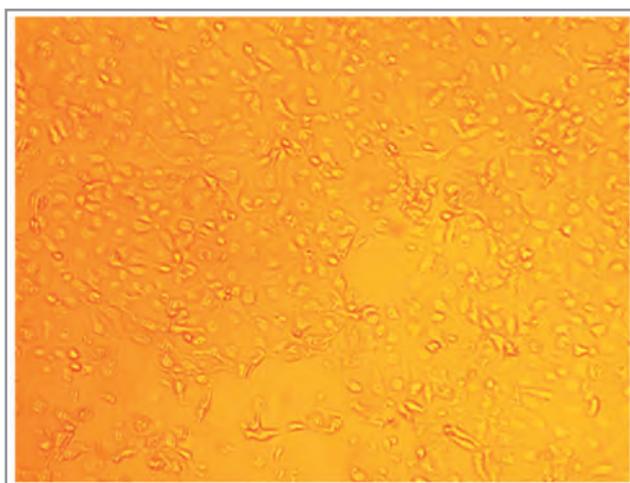


Рис. 3. Культура клеток МА-104 в присутствии Цитовира-3 без аскорбиновой кислоты на 4-е сутки после заражения.

Fig. 3. Culture of MA-104 cells in the presence of Cytovir-3 without ascorbic acid on the 4th day after infection.

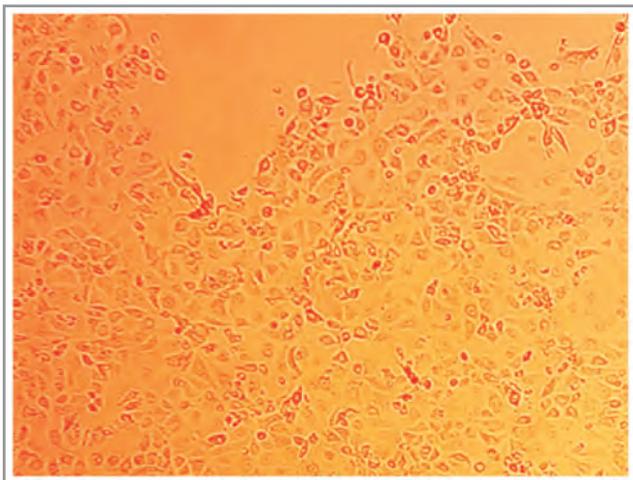


Рис. 4. Культура клеток МА-104 в присутствии Умифеновира на 4-е сутки после заражения.

Fig. 4. Culture of MA-104 cells in the presence of Umifenovir on the 4th day after infection.

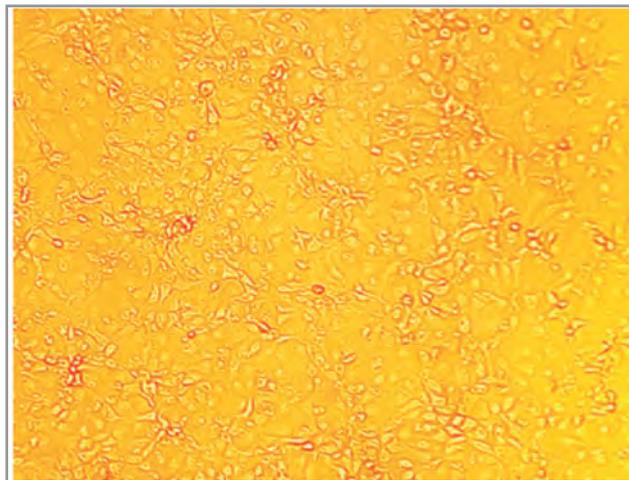


Рис. 5. Культура клеток МА-104 в присутствии Цитовира-3 на 4-е сутки после заражения.

Fig. 5. Culture of MA-104 cells in the presence of Cytovir 3 on the 4th day after infection.

ния. Наиболее выраженный цитопротекторный эффект Умифеновира, «Цитовир®-3» без аскорбиновой кислоты и «Цитовир®-3» проявился на 4-е сутки после заражения (см. рис. 3–5).

Как показало выполненное исследование в присутствии Умифеновира, «Цитовир®-3» без АК и полной композиции «Цитовир®-3» монослой клеток сохранял определённую целостность, но часть клеток все же погибла или находилась во взвешенном состоянии (см. рис. 3–5). В наибольшей степени, по сравнению с другими препаратами, монослой сохранился в присутствии препарата, представляющего полную композицию «Цитовир®-3» (см. рис. 5).

Заключение

В результате изучения противовирусной активности комплексного трехкомпонентного иммуностимулирующего препарата «Цитовир®-3», содержащего аскорбиновую кислоту, бендазол и альфа-глутамил-триптофан, было установлено что его МПК составляет 150 мкг/мл, а ЦТД₅₀ — 281,5 мкг/мл. Выявлено, что в диапазоне концентраций от 100 до 200 мкг/мл, сопоставимых с МПК и близких к ЦТД₅₀, препарат «Цитовир®-3» воспроизводимо проявляет противовирусную активность в отношении ротавируса, которая является путём достоверного повышения выживаемости клеток МА-104, в сравнении с вирусным контролем. Препарат «Цитовир®-3» в концентрации 150 мкг/мл при одновременном (лечебная схема) внесении с возбудителем и за 2 ч до вирусного инфицирования (лечебно-профилактическая схема), на всех сроках наблюдения подавляет репродукцию ротавируса на 1,0–2,0 lg

ТЦД₅₀/мл, что сопровождается достоверным снижением концентрации вирусной РНК и цитопротекторным действием. Таким образом, по результатам проведённого исследования можно предположить, что «Цитовир®-3» оказывает противовирусное действие на этапе прилипания вируса к поверхности клеток и последующего его проникновения внутрь энтероцита.

Изучение противовирусной активности композиции «Цитовир®-3» без аскорбиновой кислоты показало, что определяющая роль в проявлении противовирусных свойств препарата принадлежит двум компонентам «Цитовира®-3», а именно: бендазолу гидрохлориду и α-глутамил-триптофану натрия.

Данные, полученные в ходе выполнения данного исследования, могут служить основанием для дальнейшего проведения доклинических и клинических исследований по применению различных лекарственных форм препарата «Цитовир®-3» с целью профилактики и раннего лечения (в первые часы/сутки после инфицирования) ротавирусной инфекции как у детей (лекарственные формы препарата «Цитовир®-3» — сироп (для детей) и порошок для приготовления раствора для приёма внутрь (для детей), так и у взрослых пациентов.

Дополнительная информация

Участие авторов. Файзулов Е. Б. — дизайн и проведение исследования, статистическая обработка, редактирование публикации; Ленёва И. А. — дизайн и проведение исследования, статистическая обработка, редактирование публикации; Смирнов В. С. — дизайн исследования, редактирование публикации; Смирнова Д. И. — проведение

исследования, статистическая обработка, редактирование публикации; *Грачёва А. В.* — проведение исследования, статистическая обработка, редактирование публикации; *Корчевая Е. Р.* — проведение исследования, статистическая обработка, редактирование публикации; *Хохлова Д. М.* — проведение исследования, статистическая обработка, редактирование публикации; *Кудрявцева Т. А.* — дизайн исследования, написание публикации; *Петленко С. В.* — дизайн исследования, редактирование публикации; *Заплутанов В. А.* — дизайн исследования, написание публикации.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (Москва, Россия) по заказу и финансовой поддержке АО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед» (Санкт-Петербург, Россия).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Troeger C., Khalil I.A., Rao P.C., Cao S., Blacker B.F., Ahmed T. et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatr.* 2018; 172 (10): 958–965. doi: 10.1001/jamapediatrics.2018.1960.
2. Mathijnsens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Banyai K., Estes M.K. et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008; 153 (8): 1621–1629. doi: 10.1007/s00705-008-0155-1.
3. Marova A.A., Oksanich A.S., Kaira A.N. et al. Experience of application of multiplex qPCR for differential diagnostics of intestinal viral infections. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2012; 89 (6): 39–45.
4. Stephen C., Hauser M., Pardi D. et al. Mayo clinic gastroenterology and hepatology board review. Oxford University Press. 2011. June 23; 194.
5. Santos-Ferreira, N., Van Dycke, J., Neyts, J., Rocha-Pereira J. Current and future antiviral strategies to tackle gastrointestinal viral infections. *Microorganisms.* 2021; 9 (8): 1599. doi: 10.3390/microorganisms9081599.

Информация об авторах

Файзулов Евгений Бахтиерович — к. б. н., заведующий лабораторией прикладной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7385-5083

Ленёва Ирина Анатольевна — д. б. н., заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-7755-2714

Смирнов Вячеслав Сергеевич — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБНУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2723-1496

Смирнова Дарья Ильинична — младший научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7325-0834

Additional Information

Authors' participation. *Faizuloev E. B.* — design and conduct of research, statistical processing, publication editing; *Leneva I. A.* — design and conduct of research, statistical processing, publication editing; *Smirnov V. S.* — research design, publication editing; *Smirnova D. I.* — conduct of research, statistical processing, publication editing; *Gracheva A. V.* — conduct of research, statistical processing, publication editing; *Korchevaya E. R.* — conduct of research, statistical processing, publication editing; *Kudryavtseva T. A.* — research design, publication writing; *Petlenko S. V.* — research design, publication editing; *Zaplutanov V. A.* — research design, publication writing.

Acknowledgments. The study was carried out within the framework of research work at the FSBSI «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera» (Moscow, Russia) on the order and financial support of JSC «CYTOMED» (Saint-Petersburg, Russia).

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

6. *Quest Graph™ IC50 Calculator.* AAT Bioquest. Доступно по: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>. Ссылка активна на 25.04.2024.
7. *Ramakrishnan M.A.* Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World journal of virology.* 2016; 5 (2): 85–86. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85.
8. *Freeman M.M., Kerin T., Hull J., McCaustland K., Gentsch J.* Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay. *Med Virol.* 2008; 80 (8): 1489–1496. doi: 10.1002/jmv.21228.

Поступила / Received 15.04.2024
Принята в печать / Accepted 21.04.2024

About the authors

Evgeny B. Faizuloev — Ph. D. in Biology, Head of the Laboratory of Applied Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7385-5083

Irina A. Leneva — D. Sc. in Biology, Head of the Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-7755-2714

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

Daria I. Smirnova — Junior Researcher at the Laboratory of Applied Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7325-0834

Грачева Анастасия Вячеславовна — научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8428-4482

Корчевая Екатерина Романовна — младший научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6417-3301

Хохлова Дарья Михайловна — младший научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия. ORCID ID: 0009-0003-5745-7589

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

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

Заплутанов Василий Андреевич — научный сотрудник лаборатории фармакологии пептидов АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0001-5294-6533

Anastasiia V. Gracheva — Researcher at the Laboratory of Applied Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8428-4482

Ekaterina R. Korchevaya — Junior Researcher at the Laboratory of Applied Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6417-3301

Daria M. Khokhlova — Junior Researcher at the Laboratory of Applied Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. ORCID ID: 0009-0003-5745-7589

Tatyana A. Kudryavtseva — Ph. D. in Biology, 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

Sergey V. Petlenko — D. Sc. in Medicine, Leading Researcher of 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

Vasiliy A. Zaplutanov — Researcher at the Laboratory of Pharmacology of Peptides, Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint-Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0001-5294-6533

Прогнозирование эффективности азтреонама в отношении *Klebsiella pneumoniae* по результатам оценки чувствительности бактерии к антибиотику при увеличенном инокуляте

*К. Н. АЛИЕВА, М. В. ГОЛИКОВА, Д. А. КОНДРАТЬЕВА, А. А. КУЗНЕЦОВА

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

Резюме

Актуальность. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) антибиотика не позволяет прогнозировать риск развития устойчивости бактерий под воздействием антибиотика из-за малой выборки бактерий. Минимальная подавляющая концентрация антибиотика при увеличенном инокуляте (МПК_{ВИ}) может стать подходящим для такой цели параметром за счёт увеличенной выборки и простоты определения. **Цель.** Исследование направлено на оценку потенциала использования МПК_{ВИ} как параметра для прогнозирования развития устойчивости *Klebsiella pneumoniae* к азтреонаму. **Методы.** Оценили значения МПК и МПК_{ВИ} азтреонама в отношении двух штаммов *K. pneumoniae* методом микроразведений (объём 0,2 мл; инокулят 5×10^5 и 5×10^7 КОЕ/мл, соответственно) и сопоставили результаты с эффектом азтреонама в динамической системе *in vitro*, где моделировали режим применения азтреонама 2 г каждые 8 ч в виде 2-часовой инфузии в течение 5 сут. **Результаты.** Эффективность азтреонама в отношении *K. pneumoniae*, наблюдаемая в динамической системе, согласовывалась со значениями МПК_{ВИ} после уточнения результатов по оценке жизнеспособности бактерий. При визуальной оценке значения МПК_{ВИ} были сильно завышены из-за избыточной мутности вследствие образования filamentous форм бактерий под действием азтреонама. **Заключение.** Параметр МПК_{ВИ} можно использовать для прогнозирования развития устойчивости *K. pneumoniae* к азтреонаму при оценке значений данного параметра по численности жизнеспособных клеток, но не по визуальной границе роста.

Ключевые слова: азтреонам; *K. pneumoniae*; динамическая система *in vitro*; оценка чувствительности бактерий к антибиотикам

Для цитирования: Алиева К. Н., Голикова М. В., Кондратьева Д. А., Кузнецова А. А. Прогнозирование эффективности азтреонама в отношении *Klebsiella pneumoniae* по результатам оценки чувствительности бактерии к антибиотику при увеличенном инокуляте. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (3–4): 42–50. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-42-50>. EDN: FSGBXG.

Prediction of Aztreonam Effectiveness Against *Klebsiella pneumoniae* Based on the Results of Antimicrobial Susceptibility Testing with Increased Inoculum

*KAMILLA N. ALIEVA, MARIA V. GOLIKOVA,
DARIA A. KONDRATIEVA, ANASTASIYA A. KUZNETSOVA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

Abstract

Background. The minimum inhibitory concentration (MIC) does not predict the risk of antibacterial resistance development due to a small sample of tested bacteria. Minimum inhibitory concentration at an increased inoculum (MIC_{HI}) may become a suitable parameter for this purpose as a sample of tested bacteria is larger while the method of determination remains easy. **The aim of the study** was to evaluate the potential of using MIC_{HI} as a parameter for predicting the resistance development in *Klebsiella pneumoniae* to aztreonam. **Methods.** Aztreonam MIC and MIC_{HI} values were assessed against two strains of *K. pneumoniae* using the microdilution method (0.2 ml volume; inoculum of 5×10^5 and 5×10^7 CFU/ml, respectively) and compared the results with the effect of aztreonam in a dynamic *in vitro* model, in which aztreonam regimen of 2 grams every 8 hours as a 2-hour infusion for 5 days was simulated. **Results.** The efficacy of aztreonam against *K. pneumoniae* observed in the dynamic model was consistent with the MIC_{HI}s values assessed based on bacterial viability. During the visual assessment, the MIC_{HI}s values were greatly overestimated due to excessive turbidity caused by the formation of filamentous forms of bacteria exposed to aztreonam. **Conclusions.** The MIC_{HI} parameter can be used to predict the devel-

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



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



EDN: FSGBXG

opment of resistance in *K. pneumoniae* to aztreonam when assessing the values of this parameter by the number of viable cells, but not by the visual boundary of bacterial growth.

Keywords: aztreonam; *K. pneumoniae*; *in vitro* dynamic model; antimicrobial susceptibility testing

For citation: Alieva K. N., Golikova M. V., Kondratieva D. A., Kuznetsova A. A. Prediction of aztreonam effectiveness against *Klebsiella pneumoniae* based on the results of antimicrobial susceptibility testing with increased inoculum. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (3–4): 42–50. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-42-50>. EDN: FSGBXG.

Введение

Минимальная подавляющая концентрация антибиотика (МПК) — это стандартный параметр, применяемый для оценки чувствительности бактерии к антибиотику [1] и подбора препарата для лечения пациента с инфекционным заболеванием. В свете проблемы распространения бактериальной резистентности к антибиотикам надёжность данного параметра можно считать недостаточной: значение МПК не позволяет прогнозировать риск развития устойчивости бактерий под воздействием антибиотика. Выборка бактерий при широко применяемом методе микроразведений (инокулят 5×10^5 КОЕ/мл; объём суспензии 0,2 мл) составляет 10^5 КОЕ. При частоте мутаций 10^{-6} и реже [2–4] маловероятно попадание устойчивых клеток в такую выборку. В то же время, популяция бактерий в очаге инфекции у человека может быть достаточно концентрированной, что обуславливает высокую вероятность присутствия устойчивых субпопуляций [5–7].

Подходящим для прогнозирования риска развития устойчивости бактерий может быть параметр, при определении которого используется высокая концентрация бактерий, то есть большая выборка. Минимальная концентрация, предотвращающая рост мутантов, устойчивых к антибиотику (МПК_М) — параметр такого типа, определяемый при инокуляте $\sim 10^{10}$ КОЕ/мл. Согласно результатам ряда работ, МПК_М можно использовать для прогнозирования развития резистентности бактерий [8–10]. Однако методика определения данного параметра весьма трудоёмка [11] и не подходит для клинической практики.

Минимальная подавляющая концентрация антибиотика при увеличенном инокуляте (МПК_{ВИ}) — альтернативный МПК_М параметр, который может стать подходящим вариантом для внедрения в клиническую практику благодаря методике определения, близкой к таковой для МПК: изменение состоит лишь в увеличении бактериального инокулята до 5×10^7 КОЕ/мл. При оценке МПК_{ВИ} часто наблюдали снижение чувствительности бактерий к антибиотику по сравнению с результатами оценки МПК [12]. Такой сдвиг наиболее характерен для бета-лактамовых антибиотиков и продуцентов бета-лактамаз. Снижение чувствительности в 8 и более раз называют «инокулюм эффект» (inoculum effect).

Можно предположить, что снижение чувствительности бактерий при определении МПК_{ВИ} —

это следствие присутствия в популяции устойчивых к антибиотику клеток. Согласно результатам недавнего исследования, значения МПК_{ВИ} меропенема в отношении *Klebsiella pneumoniae* схожи со значениями МПК_М [13]. Обнаруженная корреляция даёт основания полагать, что параметр МПК_{ВИ} может быть использован для прогнозирования развития устойчивости бактерий к антибиотикам.

Чтобы оценить потенциал использования МПК_{ВИ} как параметра для прогнозирования развития устойчивости *K. pneumoniae* к азтреонаму, мы оценили значения МПК_{ВИ} данного антибиотика в отношении двух штаммов и сопоставили результаты с эффектом азтреонама в динамической системе *in vitro*, где моделировали клинический режим применения антибиотика. Помимо МПК_{ВИ} определяли МПК_М для сравнения прогностической ценности этих параметров.

Материал и методы

Антибиотики и бактериальные штаммы. Азтреонам был приобретён в Clearsynth (Andheri West, Mumbai).

Объектами исследования были клинические изоляты *K. pneumoniae* 74 и 189, продуцирующие NDM-карбапенемазы.

Оценка значений МПК, МПК_{ВИ} и МПК_М. Значения МПК азтреонама в отношении исследуемых штаммов *K. pneumoniae* определяли методом микроразведений в 0,2 мл бульона Мюллера–Хинтона (МХБ) при плотности инокулята 5×10^5 КОЕ/мл [1]. Значения МПК_{ВИ} определяли в аналогичных условиях, но при плотности инокулята 5×10^7 КОЕ/мл. У выделенных из динамической системы бактерий повторно определяли значения МПК и МПК_{ВИ}. Как для МПК, так и для МПК_{ВИ} концентрацию антибиотика, подавляющую рост бактерий, определяли по отсутствию видимого роста бактерий (осадок или мутность). Штаммы характеризовали согласно пороговым значениям подавляющих концентраций EUCAST 2023 г.: ≤ 1 мкг/мл — чувствительный, >4 мкг/мл — устойчивый [14].

Помимо определения значений МПК и МПК_{ВИ} азтреонама путём визуальной оценки прозрачности/мутности лунок, значения параметров оценивали посредством определения концентрации жизнеспособных клеток, находившихся под воздействием антибиотика в лунках планшета в течение 24 ч при 37°C, и сравнения её с исходной концентрацией (5×10^5 КОЕ/мл или 5×10^7 КОЕ/мл). Значение МПК определяли как значение концентрации, при которой численность клеток была равна или ниже исходной численности, то есть рост клеток был подавлен или происходила их гибель. Для этого проводили высевы проб из всех лунок планшета на агар Мюллера–Хинтон II (МХА). После инкубирования чашек с агаром в течение 24 ч при 37°C оценивали численность бактерий и значения МПК и МПК_{ВИ} азтреонама.

Значения МПК_М азтреонама определяли по ранее описанной схеме [13]. Тестируемый микроорганизм культивировали в МХБ в течение 18–24 ч при 37°C. Затем бактериальную суспензию концентрировали методом центрифугирования

(3600×g, 20 мин) до ~10¹⁰ КОЕ/мл. Делали посевы на МХА с азтреонамом в концентрации 0,125–256 мкг/мл, инкубировали в течение 24–48 ч при 37°C и подсчитывали число колоний. В случаях неоднозначного роста, например, при образовании полупрозрачного налёта на агаре вместо чётких колоний, с агара отбирали пробу петлёй и пересеивали штрихом на агар с такой же концентрацией антибиотика, после чего агар со штрихом инкубировали и окончательно оценивали наличие или отсутствие роста микроорганизма. За МПК_М принимали наименьшую концентрацию меропенема, при которой рост бактерий полностью подавлялся.

Определение МПК, МПК_{ВИ} и МПК_М проводили не менее, чем в двух повторностях.

Фармакодинамические эксперименты в динамической системе *in vitro*. Эксперименты проводили в динамической системе *in vitro* диализного типа [15] по подробно описанной методике [16]. В качестве биореактора, моделирующего очаг инфекции, использовали картридж с целлюлозными волокнами Fiber-Cell C3001 (Fiber-Cell Systems, USA), проницаемыми для молекул антибиотика, но не бактериальных клеток. Картридж находился в термостате при 37°C, его заполняли стерильным МХБ и вводили 18-часовую культуру *K. pneumoniae* для достижения инокулята 10⁸ КОЕ/мл. Спустя 2 ч отбирали биопробы для оценки действительной стартовой численности бактерий, после чего начинали введение антибиотика.

Моделировали пятидневное лечение азтреонамом при режиме дозирования 2 г каждые 8 ч в виде 2-часовой инфузии (всего 15 инфузий); моноэкспоненциальный профиль в эпителиальной жидкости лёгких с периодом полувыведения 2 ч [17–18]. Проникновение азтреонама в эпителиальную жидкость лёгких принимали за 50% [19–21]. Значения фармакокинетических параметров были следующими: максимальная концентрация азтреонама — 31,5 мкг/мл, минимальная концентрация азтреонама — 3,95 мкг/мл, площадь под кривой концентрация антибиотика–время — 354 (мкг×ч)/мл. Для моделирования периодической инфузии антибиотика в биореактор, непрерывной элиминации антибиотика из системы с постоянной скоростью, а также постоянного перемешивания содержимого биореактора использовали перистальтические насосы Cole-Parmer Masterflex L/S (Cole-Parmer, USA).

На протяжении пятидневных экспериментов из системы отбирали биопробы для определения численности бактерий культуральным методом (посев проб на МХА), а также для оценки мутности отобранных бактериальных суспензий с помощью денситометра Densilameter II (Erba Lachema s.r.o., Brno, Czech Republic). При посеве проб на МХА, а также на МХА с азтреонамом в концентрации 2×, 4×, 8× и 16×МПК, образцы разводили при необходимости. Чашки инкубировали при 37°C в течение 24 ч и подсчитывали выросшие колонии. Предел количественного определения составлял 3,3 и 1 log КОЕ/мл для общей популяции и устойчивых субпопуляций бактерий, соответственно.

Флуоресцентная микроскопия. Чтобы изучить морфологию клеток *K. pneumoniae*, подвергнутых воздействию азтреонама, проводили флуоресцентную микроскопию с акридиновым оранжевым [22]. В бактериальную суспензию объёмом 200 мл с инокулятом 5×10⁵ КОЕ/мл добавляли азтреонам до концентрации 2 мкг/мл и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Пробы объёмом 50 мл отбирали на 0, 2, 8 и

24 часу инкубации, концентрировали методом центрифугирования (3600×g, 20 мин). Из осадка отбирали пробу объёмом 25 мкл, которую помещали на предметное стекло, высушивали в асептических условиях и окрашивали, ресуспендируя в 5 мкл 0,01% раствора акридинового оранжевого (раствор в ацетатном буфере, рН=4) и накрывали покровным стеклом. Также из осадка отбирали пробу для высева на агар, чтобы оценить жизнеспособность клеток.

Иммерсионную флуоресцентную микроскопию проводили с использованием микроскопа Leica DM IL Led. (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany), оснащённого фильтром I3 для «голубого возбуждения» (фильтр BP 450–490 нм; зеркало 510; фильтр LP515(S)) при 1000-кратном увеличении. Клетки, окрашенные акридиновым оранжевым, имели зелёную, жёлтую, оранжевую или красную флуоресценцию на зелёном фоне. Окрашенные клетки подсчитывали в 5 полях зрения, вычисляли среднее количество и пересчитывали его на численность клеток (log КОЕ/мл).

Результаты

Значения МПК азтреонама в отношении *K. pneumoniae* 74 и 189 составили 1 и 0,25 мкг/мл, соответственно, что характеризовало оба штамма как чувствительные к антибиотику (таблица). Значения МПК_{ВИ} для данных объектов превышали 256 мкг/мл, что меняло характеристику штаммов на резистентные к азтреонаму. Значения МПК_М азтреонама составили 2 и 0,5 мкг/мл в отношении *K. pneumoniae* 74 и 189, соответственно.

Результаты экспериментов в динамической системе *in vitro* представлены на рис. 1. В случае обоих штаммов наблюдали резкое снижение численности клеток в первые сутки моделируемой терапии, после которого отмечали вторичный рост у *K. pneumoniae* 74 и его отсутствие у *K. pneumoniae* 189. Устойчивость бактерий развивалась очень слабо: только в случае *K. pneumoniae* 74 появлялись клетки, устойчивые к 2×МПК азтреонама (3,4 и 2,2 log КОЕ/мл на 72 и 120 ч, соответственно). В обоих экспериментах интенсивная гибель бактерий с 0 по 6 ч сопровождалась значительным увеличением мутности бактериальной суспензии; после 1–2 сут мутность снижалась до значений, характерных для соответствующей численности жизнеспособных клеток.

Эффективность азтреонама в отношении изученных штаммов *K. pneumoniae*, наблюдаемая в динамической системе, не согласовывалась со значениями МПК_{ВИ}: от штаммов с высокой устойчивостью к антибиотику согласно данному параметру можно было ожидать интенсивного вторичного роста, сопровождаемого селекцией клеток

Значения МПК, МПК_{ВИ} и МПК_М азтреонама в отношении штаммов *K. pneumoniae* MIC, MIC_{HI} and MIC_M values of aztreonam (MICs at Standard and High Inoculum and Mutant Prevention Concentration) of *K. pneumoniae* strains

Штамм <i>K. pneumoniae</i>	МПК, мкг/мл	МПК _{ВИ} , мкг/мл	МПК _М , мкг/мл
74	1 (1)	>256 (1)	2
189	0,25 (0,25)	>256 (0,25)	0,5

Примечание. Приведены значения МПК и МПК_{ВИ}, определенные визуальным и культуральным (указаны в скобках) методами.

Note. The values of MIC and MIC_{HI} determined by visual and cultural (indicated in parentheses) methods are given.

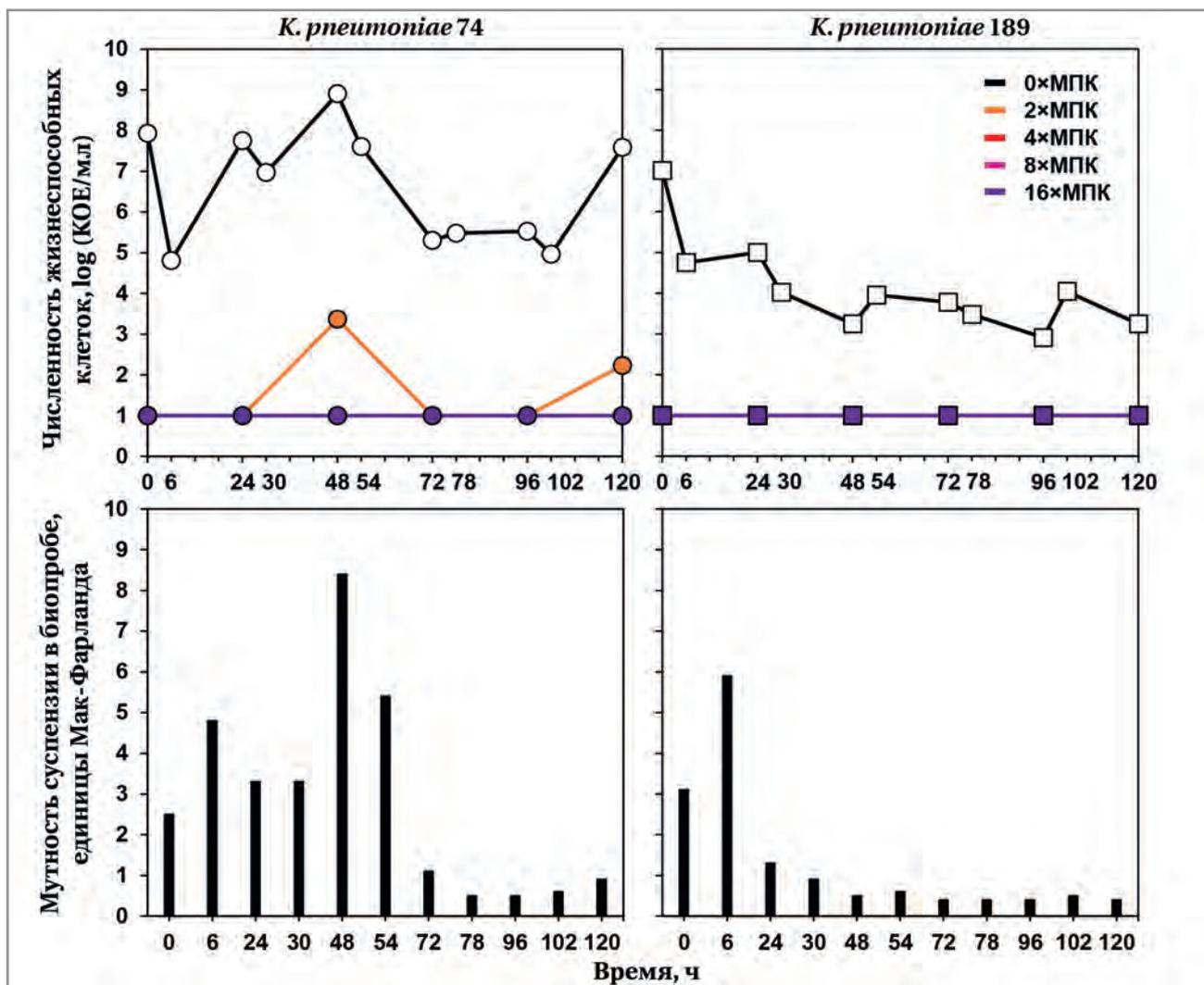


Рис. 1. Численность клеток общей популяции и устойчивых к 2–16×МПК антибиотика субпопуляций *K. pneumoniae* 74 и 189 под воздействием азтреонама в динамической системе *in vitro* и соответствующая мутность бактериальной суспензии в биопробах.

Fig. 1. The bacterial counts of the general population and subpopulations of *K. pneumoniae* 74 and 189 resistant to 2–16×MIC of the antibiotic, exposed to aztreonam in a dynamic system *in vitro*, and the corresponding turbidity of the bacterial suspension in the samples.

различного уровня устойчивости. Обратив внимание на аномальное увеличение мутности при гибели бактерий, мы предположили, что результаты определения МПК_{ви} для объектов нашего исследования могут быть завышены при визуальной оценке. Чтобы уточнить результаты оценки чувствительности к антибиотику, мы определили значения МПК и МПК_{ви} по результатам высева проб из всех лунок планшета с целью определения численности жизнеспособных клеток, находящихся под воздействием азтреонама.

При визуальном определении значений МПК_{ви} азтреонама в отношении обоих штаммов *K. pneumoniae*, мутность была примерно одинаковой во всех рядах планшета с концентрацией от 0,5 до 256 мкг/мл (рис. 2). Высевы показали, что численность клеток *K. pneumoniae* 74 и 189, начиная с концентрации антибиотика 1 и 0,25 мкг/мл,

соответственно, была ниже стартовой численности клеток (рис. 3). Следовательно, данные концентрации азтреонама — это значения МПК_{ви}. При оценке МПК граница мутности в планшете соответствовала границе роста бактерий после высевов. Примечательно, что уточнённые значения МПК_{ви} оказались равны соответствующим значениям МПК и были всего на одно двукратное разведение ниже соответствующих значений МПК_м (см. таблицу).

Итоговая характеристика обоих штаммов согласно значениям МПК и МПК_{ви} — чувствительны к азтреонаму. Такие результаты достаточно хорошо согласуются с результатами экспериментов в динамической системе и с результатами определения значений МПК_м.

Чтобы определить возможную причину сильного помутнения суспензии *K. pneumoniae* после



Рис. 2. Результаты определения МПК и МПК_{ВИ} азтреонама в отношении *K. pneumoniae* 74 и 189 при визуальной оценке.

Примечание. Концентрации в лунках 0,5–256 мкг/мл для инокулята 5×10^7 КОЕ/мл и 0,03–16 мкг/мл для инокулята 5×10^5 КОЕ/мл. АБ — контроль антибиотика; Б — контроль бактерий. Фото кадрировано и отзеркалено по вертикали.

Fig. 2. Results of determining the MIC and MIC₅₀ of aztreonam against *K. pneumoniae* 74 and 189 by visual assessment.

Note. Concentrations in wells are 0.5–256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for an inoculum of 5×10^7 CFU/ml and 0.03–16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for an inoculum of 5×10^5 CFU/ml. АБ — antibiotic control; Б — bacteria control. The photo is cropped and mirrored vertically.

воздействия азтреонама, мы изучили морфологию клеток бактерий до и после воздействия антибиотика. До воздействия азтреонама в поле зрения находились мелкие округлые палочки, расположенные одиночно или парами (рис. 4). Под влиянием антибиотика морфология клеток претерпевала сильные изменения: преимущественной формой в поле зрения становились длинные цепочки. Численность клеток согласно микроскопии была выше соответствующей численности, оценённой с помощью культурального метода. Такие результаты показывают, что клетки атипичной морфологии могут быть нежизнеспособны. Можно предположить, что скопления крупных нежизнеспособных клеток являются причиной избыточной мутности, не согласующейся со снижением численности жизнеспособных бактерий.

Обсуждение

В настоящей работе мы изучили эффект азтреонама в отношении *K. pneumoniae* в динамической системе *in vitro* и оценили его соответствие результатам определения чувствительности бактерии к антибиотику. Эффект азтреонама был умеренным в отношении *K. pneumoniae* 74 и сильным в отношении *K. pneumoniae* 189. Селекция мутантов, соответственно, была слабой или не происходила вовсе. Результаты данного исследования в целом согласуются с гипотезой «окна селекции мутантов» [11]. При определённых значениях МПК (0,25 и 1 мкг/мл) и МПК_{ВИ} или МПК_М (0,25 и 1 или 0,5 и 2 мкг/мл) «окна селекции мутантов» для обоих штаммов находились ниже профиля азтреонама при моделируемом режиме его дозиро-

вания (минимальная концентрация антибиотика — 3,95 мкг/мл) (рис. 5). В таких условиях развитие устойчивости должно подавляться. В то же время, популяция *K. pneumoniae* 74 под воздействием азтреонама сохраняла высокую жизнеспособность, что указывает на необходимость проведения дополнительных исследований для изучения этого феномена.

При определении значений МПК азтреонама в отношении *K. pneumoniae* граница мутности соответствовала подавлению роста бактерий, но в случае МПК_{ВИ} мутность не согласовывалась с концентрацией жизнеспособных клеток в лунках. Это следует учитывать, как возможный фактор, искажающий результаты визуальной оценки значений МПК_{ВИ} азтреонама.

Увеличение мутности на фоне гибели клеток может быть следствием изменения их морфологии под воздействием азтреонама — образования атипичных громоздких и нежизнеспособных бактериальных форм. Ранее мы изучили морфологию *K. pneumoniae* под воздействием меропенема: у подвергнутых воздействию антибиотика клеток отмечали увеличение размера и образование шарообразной формы, но не наблюдали цепочек, занимающих много пространства в поле зрения [22]. В ряде работ описаны закономерности изменения морфологии клеток в ответ на воздействие антибиотика [23–24]. Завышение значений МПК_{ВИ} азтреонама и цефалоспоринов при оценке на основе мутности прежде также связывали с образованием филаментных форм у энтеробактерий, включая *K. pneumoniae* [23]. Авторы данной работы рассматривали избыточную мутность как причину «инокулюм эффекта», который

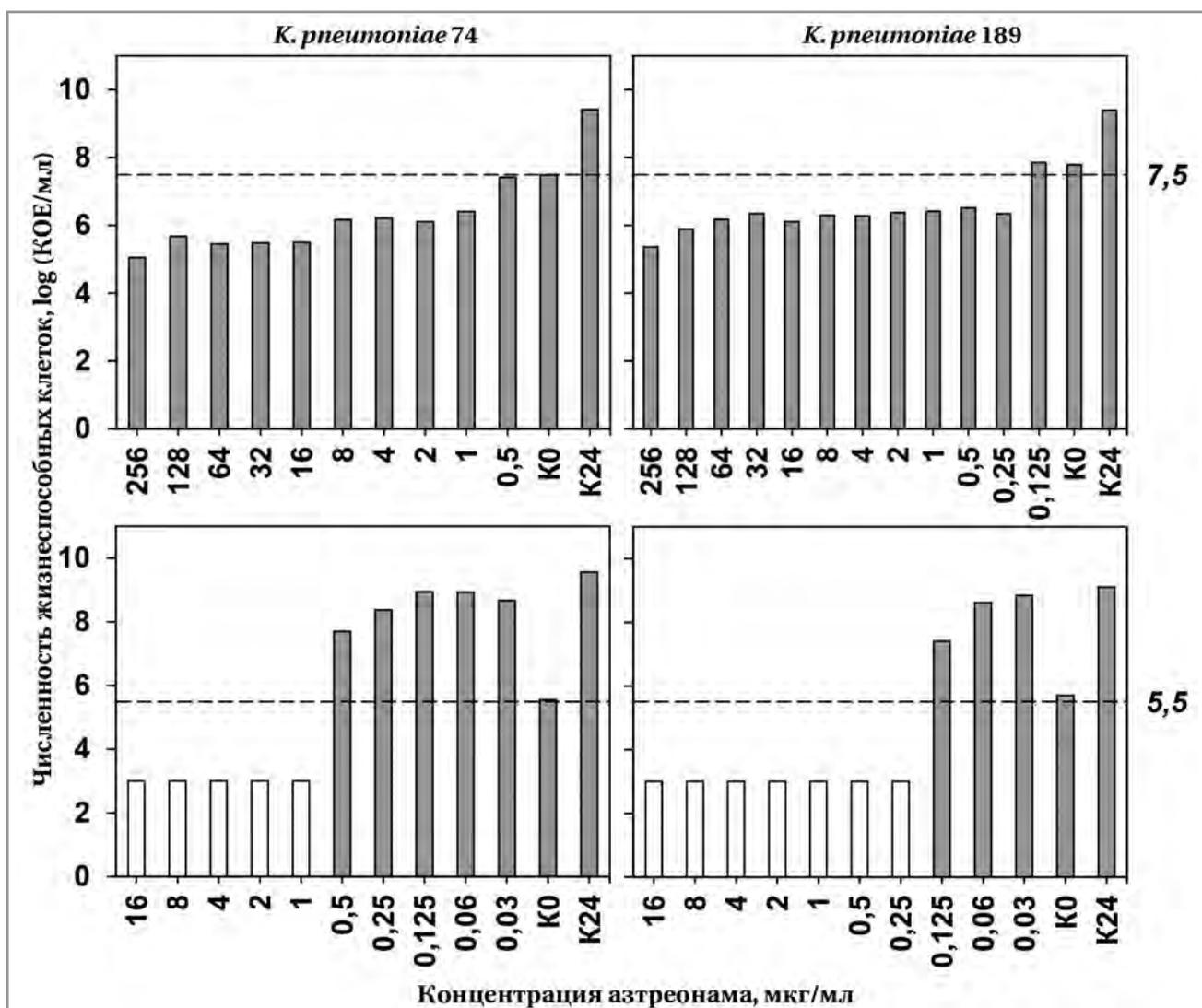


Рис. 3. Результаты определения МПК и МПК_М азтреонама в отношении *K. pneumoniae* после применения культурального метода для оценки численности бактерий.

Примечание. Серый — визуальный рост; белый — отсутствие визуального роста. К0 — контроль бактерий на 0 ч; К24 — контроль бактерий на 24 ч. Пунктиром обозначена исходная численность бактерий (log, КОЕ/мл).

Fig. 3. Results of determining the MIC and MIC_M of aztreonam against *K. pneumoniae* after applying the cultural method to assess the number of bacteria.

Note. Grey — visual growth; white — lack of visual growth. K0 — bacteria control at 0 h; K24 — bacteria control at 24 hours. The dotted line indicates the initial number of bacteria (log (CFU/ml)).

представлялся фактором, мешающим определению МПК при завышении стартовой концентрации бактерий. Мы же рассматриваем «инокулюм эффект» как влияние устойчивых клеток, попадающих в увеличенную выборку, на чувствительность бактерий к антибиотику. Избыточная мутность в рамках наших рассуждений — это фактор, мешающий точному определению МПК_{ВИ} азтреонама при визуальной оценке. Важно подчеркнуть, что подобного феномена избыточной мутности на фоне активной гибели клеток мы не наблюдали в случае с меропенемом [13]. Для этого антибиотика наблюдалась чёткая корреляция между мутностью и концентрацией клеток в питательной среде, что позволяло определять

значения МПК_{ВИ} визуально. При этом «инокулюм эффект» обнаруживался у всех изученных штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы, подвергнутых действию меропенема.

Завышение значений МПК_{ВИ} при визуальной оценке могло быть причиной, по которой они не согласовывались с эффектом антибиотика *in vivo* при увеличенной микробной нагрузке [25]. Чтобы проверить данное предположение, следует провести углублённую оценку МПК_{ВИ} с различными объектами и определить, для каких из них характерно значительное возрастание мутности питательной среды на фоне интенсивной деформации клеток под действием антибиотика. В то же время, растёт количество работ, где сообщается

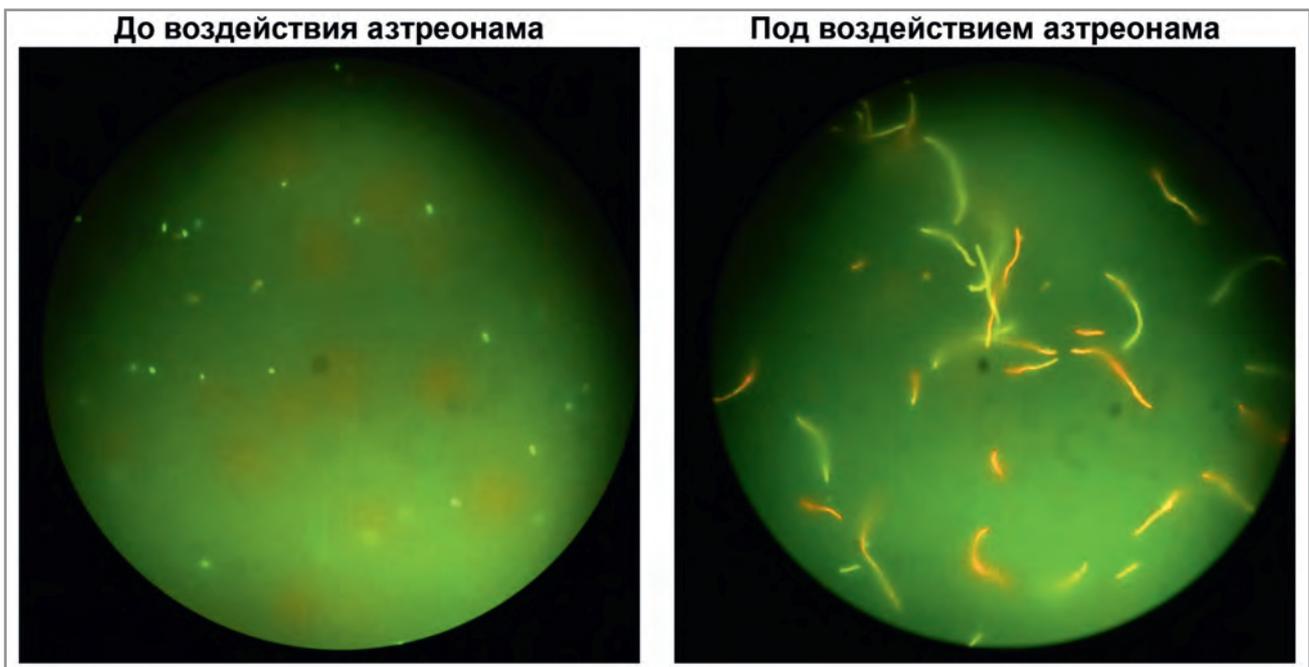


Рис. 4. Морфология клеток *K. pneumoniae* 74 до и после воздействия азтреонама.
 Fig. 4. Morphology of *K. pneumoniae* 74 cells before and after exposure to aztreonam.

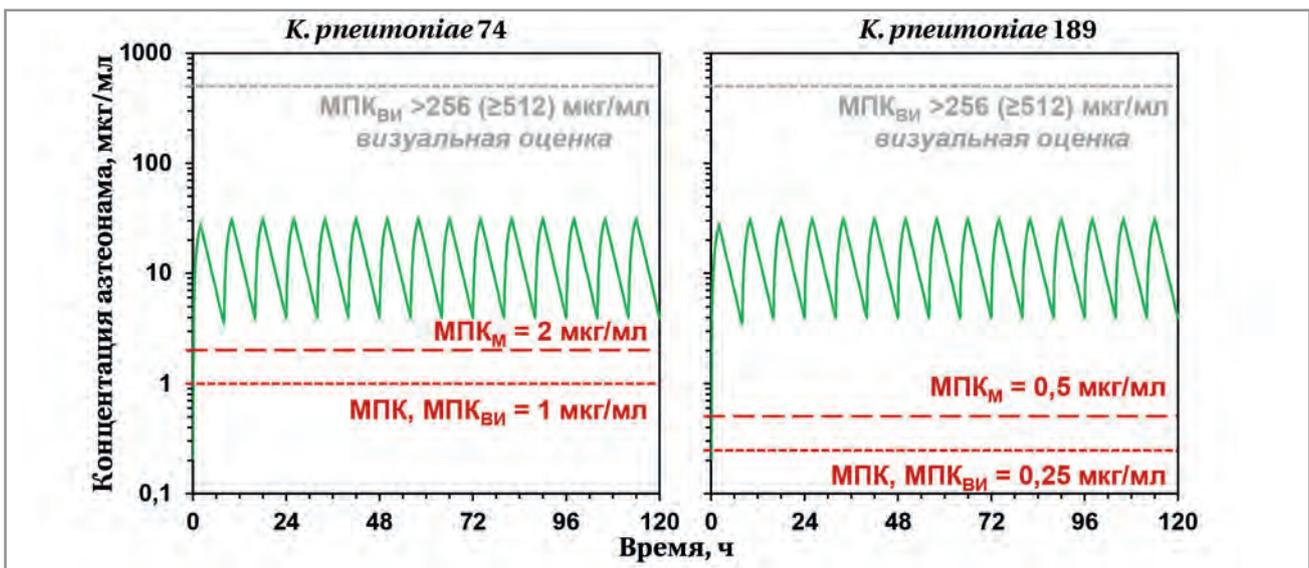


Рис. 5. Расположение моделируемого фармакокинетического профиля азтреонама относительно уровней МПК, МПК_{ВИ} и МПК_М.

Примечание. Значения МПК_{ВИ} после уточнения с помощью культурального метода.

Fig. 5. Location of the simulated pharmacokinetic profile of aztreonam relative to the levels of MIC, MIC_{VI} and MIC_M values.
 Note. MIC_{VI} values after clarification by the cultural method.

о соответствии между «инокулюм эффектом» и снижением эффективности антибиотика *in vivo* [26–32]. В данных работах МПК_{ВИ} оценивали визуально, следовательно избыточная мутность может быть характерна для ограниченного количества объектов. Отдельно следует отметить, что оценка МПК_{ВИ} в случае избыточной мутности нуждается в проработке быстрых и простых способов определения численности жизнеспособных клеток: необходимость дополнительных вы-

севок и культивирования усложняет методику и увеличивает длительность теста.

Значения МПК_{ВИ} после уточнения результатов и значения МПК_М были схожими, что согласуется с результатами проведенного ранее исследования с меропенемом и *K. pneumoniae* [13]. Такие результаты свидетельствуют о том, что МПК_{ВИ} можно продолжать изучать в качестве альтернативного МПК_М параметра для использования в качестве верхнего уровня «окна селекции

мутантов» и прогнозирования развития резистентности бактерий к антибиотикам.

Ограничения исследования

Данное исследование было проведено с двумя штаммами *K. pneumoniae*. Для подтверждения результатов следует провести исследования с большим количеством объектов.

Заключение

Параметр МПК_{ВИ} можно использовать для прогнозирования развития устойчивости *K. pneumoniae* к азтреонаму при оценке значений данного параметра по численности жизнеспособных клеток, но не по визуальной границе роста. Параметр МПК_{ВИ} можно рассматривать как альтернативу МПК_М в качестве верхнего уровня «окна селекции мутантов». При определении МПК_{ВИ} необходимо учитывать фактор избыточной мутности в случае объектов тестирования, для которых он характерен.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (№ 22-75-00066).

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

Участие авторов. Алиева К. Н. — общее руководство работой, планирование исследования, анализ и интерпретация результатов на всех этапах исследования; проведение исследований в динамической системе *in vitro* и оценка динамики численности общей популяции клеток и устойчивых

к антибиотику субпопуляций культуральными методами; проведение флуоресцентной микроскопии; написание, редактирование и проверка текста публикации. Голикова М. В. — планирование исследования; написание, редактирование и проверка текста публикации; финальное утверждение рукописи. Кондратьева Д. А. — ведение бактериальных культур, оценка чувствительности бактерий к антибиотикам; проверка текста публикации. Кузнецова А. А. — оценка чувствительности бактерий к антибиотикам; проверка текста публикации.

Additional Information

Source of financing. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (No. 22-75-00066).

Conflict of interest. The authors of the article have confirmed that there are no conflicts of interest to disclose.

Authors' participation. Alieva K. N. — general management of the work, research planning, analysis and interpretation of results at all stages of the study; conducting studies in a dynamic *in vitro* system and assessing the dynamics of the total population of cells and antibiotic-resistant subpopulations using cultural methods; performing fluorescence microscopy; writing, editing and checking the text of the publication. Golikova M. V. — research planning; writing, editing and checking the text of the publication; final approval of the manuscript. Kondratyeva D. A. — maintaining bacterial cultures, assessing the susceptibility of bacteria to antibiotics; checking the text of the publication. Kuznetsova A. A. — assessment of the susceptibility of bacteria to antibiotics; reviewing the publication text.

Литература/References

1. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 20776-1-2022. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод микроразведений в бульоне для лабораторного исследования активности антимикробных агентов по отношению к быстрорастущим аэробным бактериям, вызывающим инфекционные заболевания. [National'nyj standart Rossijskoj Federatsii GOST R ISO 20776-1-2022. Issledovanie chuvstvitel'nosti infektsionnykh agentov i otsenka funktsional'nykh kharakteristik izdelij dlya issledovaniya chuvstvitel'nosti k antimikrobnym sredstvam. Chast' 1. Referentnyj metod mikrorazvedenij v bul'one dlya laboratornogo issledovaniya aktivnosti antimikrobnym agentov po otnosheniyu k bystrorastushchim aerobnym bakteriyam, vyzvayvayushchim infektsionnye zabolevaniya. (in Russian)]
2. Baquero M., Galán J.C., del Carmen Turrientes M., Cantón R., Coque T.M., Martínez J.L., et al. Increased mutation frequencies in *Escherichia coli* isolates harboring extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49 (11): 4754–4756. doi: 10.1128/AAC.49.11.4754-4756.2005.
3. Woodford N., Ellington M.J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13 (1): 5–18. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x.
4. Mushtaq S., Vickers A., Ellaby N., Woodford N., Livermore D.M. Selection and characterization of mutational resistance to aztreonam/avibactam in β -lactamase-producing *Enterobacterales*. *J Antimicrob Chemother.* 2022; 77: 98–111. doi: 10.1093/jac/dkab346.
5. Zaccard C.R., Schell R.F., Spiegel C.A. Efficacy of bilateral bronchoalveolar lavage for diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2009; 47 (9): 2918–2924. doi: 10.1128/JCM.00747-09.
6. Gadsby N.J., McHugh M.P., Russell C.D., Mark H., Conway Morris A., Laurenson I.F., et al. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Inf.* 2015; 21 (8): 788.e1-788.e13. doi: 10.1016/j.cmi.2015.05.004.
7. Wang H., Gu X., Weng Y., Xu T., Fu Z., Peng W., et al. Quantitative analysis of pathogens in the lower respiratory tract of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulmonary Medicine.* 2015; 15: 94. doi: 10.1186/s12890-015-0094-z.
8. Homma T., Hori T., Sugimori G., Yamano Y. Pharmacodynamic assessment based on mutant prevention concentrations of fluoroquinolones to prevent the emergence of resistant mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51 (11): 3810–3815. doi: 10.1128/AAC.01372-06.
9. Firsov A.A., Smirnova M.V., Strukova E.N., Vostrov S.N., Portnoy Y.A., Zinner S.H. Enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 32: 488–493. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.06.031.
10. Liang B., Bai N., Cai Y., Wang R., Drlica K., Zhao X. Mutant prevention concentration-based pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as dosing targets for suppressing the enrichment of levofloxacin-resistant subpopulations of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (5): 2409–2412. doi: 10.1128/AAC.00975-10.

11. Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis*. 2001; 33 (Suppl 3): S147–S156. doi: 10.1086/321841.
12. Lenhard J.R., Bulman Z.P. Inoculum effect of b-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74: 2825–2843. doi: 10.1093/jac/dkz226.
13. Golikova M.V., Strukova E.N., Alieva K.N., Ageevets V.A., Avdeeva A.A., Sulian O.S., et al. Meropenem MICs at standard and high inocula and mutant prevention concentration inter-relations: comparative study with non-carbapenemase-producing and OXA-48-, KPC- and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics*. 2023; 12: 872. doi: 10.3390/antibiotics12050872.
14. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 13.0, 2023. Доступно по: <http://www.eucast.org>. Ссылка активна на 16.11.2023.
15. Blaser J., Stone B.B., Zinner S.H. Two compartment kinetic model with multiple artificial capillary units. *J Antimicrob Chemother*. 1985; 15 (Suppl A): 131–137. DOI: 10.1093/jac/15.suppl_A.131.
16. Alieva K.N., Golikova M.V., Dovzhenko S.A., Kobrin M.B., Strukova E.N., Ageevets V.A., et al. Testing the mutant selection window hypothesis with meropenem: In vitro model study with OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS ONE*. 2023; 18 (8): e0288660. doi: 10.1371/journal.pone.0288660.
17. Lodise T.P., Smith N.M., O'Donnell N., Eakin A.E., Holden P.N., Boissonneault K.R., et al. Determining the optimal dosing of a novel combination regimen of ceftazidime/avibactam with aztreonam against NDM-1-producing Enterobacteriaceae using a hollow-fibre infection model. *J Antimicrob Chemother*. 2020; 75: 2622–2632. DOI: 10.1093/jac/dkaa197
18. Xu H. Zhou W., Zhou D., et al. Evaluation of aztreonam dosing regimens in patients with normal and impaired renal function: a population pharmacokinetic modeling and Monte Carlo simulation analysis. *J Clin Pharmacol*. 2017; 57: 336–344. doi: 10.1002/jcph.810.
19. Cies J.J., LaCourse R.J., Moore II W.S., Chopra A. Therapeutic drug monitoring of prolonged infusion aztreonam for multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A Case Report. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2017; 22 (6): 467–470. doi: 10.5863/1551-6776-22.6.467.
20. Feng K., Jia N., Zhu P., Sy S., Liu Y., Dong D., et al. Aztreonam/avibactam effect on pharmacodynamic indices for mutant selection of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* harbouring serine- and New Delhi metallo-β-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2021; 76: 2875–2883. DOI: 10.1093/jac/dkab292.
21. Zhang J., Wu M., Diao S., Zhu S., Song C., Yue J., et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of aztreonam/amoxicillin/clavulanate combination against New Delhi metallo-β-lactamase and serine-β-lactamase co-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmaceutics*. 2023; 15: 251. doi: 10.3390/pharmaceutics15010251.
22. Alieva K.N., Golikova M.V., Kuznetsova A.A., Zinner S.H. Fluorescence microscopy: determination of meropenem activity against *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics*. 2023; 12: 1170. doi: 10.3390/antibiotics12071170.
23. Eng R.H.K., Cherubin C., Smith S.M., Buccini F. Inoculum effect of β-lactam antibiotics on Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985; 28 (2): 601–606. doi: 10.1128/aac.28.5.601.
24. Cushnie TPT, O'Driscoll NH, Lamb AJ. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73: 4471–4492. doi: 10.1007/s00018-016-2302-2.
25. Maglio D., Ong C., Banevicius M.A., Geng Q., Nightingale C.H., Nicolau D.P. Determination of the *in vivo* pharmacodynamic profile of cefepime against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* at various inocula. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48 (6): 1941–1947. doi: 10.1128/AAC.48.6.1941–1947.2004.
26. Szabó D., Máthé A., Filetőth Z., Anderlik P., Rókusz L., Rozgonyi F. *In vitro* and *in vivo* activities of amikacin, cefepime, amikacin plus ceftazidime, and imipenem against an SHV-5 extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45 (4): 1287–1291. doi: 10.1128/aac.45.4.1287-1291.2001.
27. Mizunaga S., Kamiyama T., Fukuda Y., Takahata M., Mitsuyama J. Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on *in vitro* activities and *in vivo* efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 91–96. doi: 10.1093/jac/dki163.
28. Lee D.-G., Murakami Y., Andes D.R., Craig W.A. Inoculum effects of ceftobiprole, daptomycin, linezolid, and vancomycin with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* at inocula of 10⁵ and 10⁷ CFU injected into opposite thighs of neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57 (3): 1434–1441. DOI: 10.1128/aac.00362-12.
29. Harada Y., Morinaga Y., Kaku N., Nakamura S., Uno N., Hasegawa H., et al. *In vitro* and *in vivo* activities of piperacillin-tazobactam and meropenem at different inoculum sizes of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: O831–O839. doi: 10.1111/1469-0691.12677.
30. Saeki M., Shinaqawa M., Yakuwa Y., Nirasawa S., Sato Y., Yanagihara N., et al. Inoculum effect of high concentrations of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* on the efficacy of ceftazolin and other betalactams. *J Infect Chemother*. 2018; 24 (3): 212–215. doi: 10.1016/j.jiac.2017.10.021.
31. Fantin B., Poujade J., Grégoire N., Chau F., Roujansky A., Kieffer N., et al. The inoculum effect of *Escherichia coli* expressing mcr-1 or not on colistin activity in a murine model of peritonitis. *Clin Microbiol Inf*. 2019; 25 (12): 1563.e5–1563.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2019.08.021.
32. McNeil J.C., Sommer L.M., Boyle M., Hogan P., Vallejo J.G., Hultén K.G., et al. Cefazolin inoculum effect and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* osteoarticular infections in children. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64 (9): e00703-20. doi: 10.1128/AAC.00703-20.

Поступила / Received 20.02.2024
Принята в печать / Accepted 21.03.2024

Информация об авторах

Алиева Камилла Натиговна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории фармакокинетики и фармакодинамики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-2107-8259. ResearcherID: AAG-6869-2019. eLibrary SPIN-код: 2071-1734. Scopus Author ID: 57197836617

Голикova Мария Владимировна — к. б. н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-7588-1733. ResearcherID: O-7873-2016. eLibrary SPIN-код: 9078-4922. Scopus Author ID: 56497807500

Кондратьева Дарья Андреевна — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID: 0009-0008-9953-135X

Кузнецова Анастасия Алексеевна — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-2092-5559. eLibrary SPIN-код: 8729-8502

About the authors

Kamilla N. Alieva — Ph. D. in Biology, Researcher at the Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2107-8259. ResearcherID: AAG-6869-2019. eLibrary SPIN: 2071-1734. Scopus Author ID: 57197836617

Maria V. Golikova — Ph. D. in Biology, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-7588-1733. ResearcherID: O-7873-2016. eLibrary SPIN: 9078-4922. Scopus Author ID: 56497807500

Daria A. Kondratieva — Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0009-0008-9953-135X

Anastasiya A. Kuznetsova — Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2092-5559. eLibrary SPIN: 8729-8502

Случай первичного иммунодефицита с иммунной дисрегуляцией: особенности клинической манифестации и сложности диагностики

*Е. Н. СЕРЕБРЯКОВА^{1,2}, Т. В. ШИЛОВА^{1,2},
А. С. КОЖЕВНИКОВ^{1,2}, Э. И. КИЛЬМУХАМЕТОВА^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

² Челябинская областная детская клиническая больница, Челябинск, Россия

Резюме

В статье представлено описание случая редкого первичного иммунодефицита с иммунной дисрегуляцией — дефицита CD25 с манифестацией в неонатальном периоде в виде тяжелой хронической диареи, подверженности вирусным, бактериальным, грибковым инфекциям, аутоиммунными проявлениями, синдромом мальабсорбции, гипотрофией, поражением кожи, подтвержденного обнаруженной при анализе ДНК гомозиготной мутацией в гене *IL2-RA*. В статье рассматривается роль *IL2-RA* в созревании и дифференцировке Т-лимфоцитов, современные подходы к классификации первичных иммунодефицитов с иммунной дисрегуляцией, принципы диагностики и лечения дефицита CD25, проводится анализ и сопоставление других описанных в литературе случаев дефицита CD25.

Ключевые слова: дефицит CD25; первичный иммунодефицит с иммунной дисрегуляцией; диагностика; клинические проявления

Для цитирования: Серебрякова Е. Н., Шилова Т. В., Кожевников А. С., Кильмухаметова Э. И. Случай первичного иммунодефицита с иммунной дисрегуляцией: особенности клинической манифестации и сложности диагностики. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (3–4): 51–57. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-51-57>. EDN: KKPVRM.

A Case of Primary Immunodeficiency with Immune Dysregulation: Features of Clinical Manifestation and Diagnostic Difficulties

*ELENA N. SEREBRYAKOVA^{1,2}, TATIANA V. SHILOVA^{1,2},
ARTEM S. KOZHEVNIKOV^{1,2}, ELINA I. KILMUKHAMETOVA^{1,2}

¹ South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk Regional Children's Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia

Abstract

The article describes a case of a rare primary immunodeficiency with immune dysregulation — CD25 deficiency with manifestation in the neonatal period in the form of severe chronic diarrhea, susceptibility to viral, bacterial, and fungal infections, autoimmune manifestations, malabsorption syndrome, hypotrophy, skin lesions, confirmed by a homozygous mutation in the *IL2-RA* gene detected by DNA analysis. The article discusses the role of *IL2-RA* in the maturation and differentiation of T-lymphocytes, modern approaches to the classification of primary immunodeficiencies with immune dysregulation, principles of diagnosis and treatment of CD25 deficiency, as well as analyzes and compares other cases of CD25 deficiency described in the literature.

Keywords: CD25 deficiency; primary immunodeficiency with immune dysregulation; diagnosis; clinical manifestations

For citation: Serebryakova E. N., Shilova T. V., Kozhevnikov A. S., Kilmukhametova E. I. A case of primary immunodeficiency with immune dysregulation: features of clinical manifestation and diagnostic difficulties. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (3–4): 51–57. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-51-57>. EDN: KKPVRM.

Введение

Первичные иммунодефициты с иммунной дисрегуляцией, согласно обновленной в 2022 г. классификации Международного союза иммуно-

логических сообществ (International Union of Immunological Societies, IUIS), относят к 4-му классу, в который включены следующие группы заболеваний: 1) Семейный гемофагоцитарный лимфо-

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



EDN: KKPVRM

*Correspondence to:
E-mail: doctor-hit@yandex.ru



гистиоцитоз; 2) Семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз с гипопигментацией; 3) Дефекты регуляторных Т-клеток; 4) Аутоиммунные синдромы с лимфопролиферацией/без лимфопролиферации; 5) Иммунная дисрегуляция с колитом; 6) Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром; 7) Восприимчивость к вирусу Эбштейна–Барра и лимфопролиферативные заболевания [1].

Дефицит альфа-субъединицы рецептора интерлейкина-2 (IL-2RA, CD25) — первичный иммунодефицит с нарушением иммунной регуляции, относится к группе дефектов регуляторных Т-клеток, развивается в результате мутаций в гене *IL2RA*, кодирующем альфа-цепь рецептора к интерлейкину-2 с аутосомно-рецессивным механизмом наследования. У лиц с дефицитом IL-2RA с младенческого возраста имеют место рецидивирующие вирусные, грибковые, бактериальные инфекции, лимфоаденопатия, аутоиммунные заболевания, в том числе аутоиммунная энтеропатия и экзематозные поражения кожи [2, 3].

Интерлейкин-2 (IL-2) в основном продуцируется активированными Т-лимфоцитами, стимулирует рост и дифференцировку Т-лимфоцитов, в частности, способствуя дифференцировке Т-супрессоров, предотвращающих аутоиммунные реакции, дифференцировке Т-клеток памяти, обеспечивающих противомикробную защиту, также IL-2 стимулирует рост и дифференцировку Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, NK-клеток, тем самым играя ключевую роль в поддержании клеточно-опосредованного иммунитета. Действие IL-2 реализуется при взаимодействии с рецептором к IL-2 (IL-2R), гетеротримерным протеином, который экспрессируется на поверхности иммунных клеток. Три рецепторные цепи IL-2R α (IL-2RA, CD25), β (IL-2RB, CD122) и γ (IL-2RG, CD132) экспрессируются не одинаково в различных типах клеток и, таким образом, образуют низкоаффинные, промежуточные и высокоаффинные рецепторы к IL-2. IL-2RA связывает IL-2 с низким сродством, комбинация IL-2RB и IL-2RG — с промежуточным сродством, комбинация трёх рецепторных цепей α (IL-2RA, CD25), β (IL-2RB, CD122) и γ (IL-2RG, CD132) образует IL-2R с высоким сродством. В результате нарушения синтеза альфа цепи IL-2R вследствие мутаций в гене *IL2RA* индивидум демонстрирует иммунную недостаточность, связанную с нарушением противомикробной защиты, и аутоиммунные заболевания в результате нарушения роста и дифференцировки Т-лимфоцитов, в том числе сходные с первичными иммунодефицитами с иммунной дисрегуляцией, в частности с X-сцепленным синдромом иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии (IPEX-синдромом), при котором обнаруживают мутации в гене белка 3 forkhead box (FoxP3), являющийся факто-

ром транскрипционной активности и репрессии регуляторных Т-клеток [3–5].

Материал и методы

Мы представляем случай дефицита CD25, подтверждённого выявленной мутацией в гене *IL-2RA*. Пациент находился под нашим наблюдением в течение 2 мес., за время наблюдения пациенту были проведены лабораторные методы исследования, позволившие исключить наследственные заболевания обмена веществ и подтвердить первичный иммунодефицит с иммунной дисрегуляцией, по результатам исследования ДНК по технологии секвенирования методом парно-концевого чтения.

Результаты

Пациент Д., мальчик, поступил в отделение новорождённых Челябинской детской областной клинической больницы (ЧОДКБ) в возрасте 3 мес. с жалобами на повторные эпизоды лихорадки, жидкий стул со слизью.

Из анамнеза заболевания известно, что в возрасте двух нед. у ребёнка появился жидкий стул со слизью, на 4-е сутки заболевания появилась рвота, на 7-е сутки заболевания (возраст 3 нед.) — фебрильная лихорадка, ребёнок был госпитализирован в инфекционное отделение Городской клинической больницы № 9 г. Челябинска, а на 2-е сутки госпитализации по тяжести состояния переведён в отделение анестезиологии и реанимации Городской клинической больницы № 9 г. Челябинска, где получал патогенетическую, этиотропную, симптоматическую терапию (инфузионная терапия, частичное энтеральное питание, парентеральное питание, антибактериальная терапия). На фоне проводимой терапии сохраняется диарея, нарушение водно-электролитного баланса (стойкая гипонатриемия, отёки), в связи со стойкой гипонатриемией, по рекомендации эндокринолога, начата терапия гидрокортизоном, с последующей коррекцией дозы и восстановлением концентрации уровня натрия до физиологической нормы, с постепенным снижением дозы и отменой гидрокортизона с учётом получения нормальных значений уровня адренокортикотропного гормона, уровня кортизола и 17-гидроксипрогестерона. На 13-е сутки пребывания в стационаре методом мультиспиральной компьютерной томографии диагностирован тромбоз верхней яремной вены, плечевоголовной и верхней полой вены, по поводу которого начата гепаринотерапия с коррекцией дозы под контролем параметров гемостаза. Ребенок получил курс внутривенного иммуноглобулина, получена некоторая положительная динамика — увеличен объём энтерального питания, сократился объём патологических потерь со стулом, уменьшились отёки. На 26-е сутки (возраст 1,5 мес.) пребывания в стационаре клинические и лабораторные признаки системного

воспалительного ответа — лихорадка, гранулоцитоз, нарастание уровня СРБ, начата антибактериальная, противогрибковая терапия, проведён курс внутривенного иммуноглобулина, получена положительная динамика, после отмены антибактериальной, противогрибковой терапии (возраст 2 мес.) — лихорадка, диарея, в стуле примесь большого количества крови. В ликворе методом ПЦР обнаружены *Haemophilus influenzae* и *Candida albicans*, установлен диагноз менингит, начата антибактериальная и противогрибковая терапия. В крови методом ПЦР выявлена цитомегаловирусная инфекция. Ребёнку проведён курс иммуноглобулина человека антицитомегаловирусного, получена кратковременная положительная динамика, далее вновь повторные эпизоды лихорадки, диареи на фоне антибактериальной терапии широкого спектра действия, при повторных люмбальных пункциях выявлено нарастание цитоза в ликворе, в общем и биохимическом анализах крови лабораторные критерии системного воспалительного ответа (повышение концентрации С-реактивного белка, прокальцитонина, гранулоцитоз), бактериологический посев крови роста не дал. По данным компьютерной томографии головного мозга, признаки кортикальной атрофии, по данным компьютерной томографии органов брюшной полости — гепатоспленомегалия, пневматоз кишечника, расширение правого мочеточника. В возрасте 3 мес. у ребёнка признаки поражения кожи (генерализованная папулезная сыпь, гиперемия в естественных складках кожи, крупнопластинчатое и мелкопластинчатое шелушение кожи). При инструментальном обследовании при колоноскопии выявлены признаки язвенного терминального илеита, умеренно выраженного катарального колита, при эзофагодуоденоскопии поверхностный гастрит с геморрагическим компонентом, эрозивный бульбит. По поводу нарастания анемии за время пребывания в инфекционном отделении ребёнку неоднократно проводились трансфузии препаратов крови. Для исключения первичного иммунодефицита, наследственных болезней обмена для дальнейшего обследования и лечения рекомендован перевод в ЧОДКБ с заключительным диагнозом при переводе: «Генерализованная инфекция сочетанной вирусно-грибково-бактериальной этиологии с поражением центральной нервной системы (менингит), кожных покровов, слизистых оболочек, мочеполовой системы, желудочно-кишечного тракта (эрозивный гастрит, гастроэнтероколит, язва терминального отдела подвздошной кишки), тяжёлой степени».

Из анамнеза жизни известно, что пациент Д. родился от второй беременности, которая протекала на фоне хронического бронхита, хронического цистита, анемии лёгкой степени у матери, вtorых своевременных индуцированных быстрых

самостоятельных родов на сроке 41 нед., масса при рождении 3420 г, оценка по шкале Апгар 8/9 баллов. Близкородственный брак родители ребенка отрицают, по национальности родители узбеки. С рождения состояние удовлетворительное, ребёнок приложен к груди в родильном зале, в возрасте 3 сут выписан из родильного дома под наблюдением участкового врача педиатра, в течение первых двух недель жизни до возникновения настоящего заболевания состояние было удовлетворительным, находился на грудном вскармливании по требованию.

При поступлении в отделение новорождённых ЧОДКБ состояние ребёнка тяжёлое, тяжесть состояния обусловлена проявлениями синдрома системного воспалительного ответа, распространённым дерматитом, признаками артрита левого коленного и правого тазобедренного суставов, гипотрофией, синдромом мальабсорбции.

При лабораторном обследовании за время динамического наблюдения неоднократно выявлялся лейкоцитоз до максимальных значений $19,7 \times 10^9/\text{л}$, С-реактивный белок — до 118,49 мг/л, лактат — до 4,9 ммоль/л, прокальцитонин — до 1,86 нг/мл. Уровень витамина Д — 20,5 нг/мл. В ликворе цитоз — до 512 клеток в 1 мкл за счёт активированных моноцитов и лимфоцитов.

В иммунограмме: иммуноглобулины: IgG 9,1 г/л, IgM 1,4 г/л, IgA 1,0 г/л, CD3 79,8, CD3+CD4+ 30,7, CD3+CD8+ 46,8, К (4/8) 0,66, CD16 14,9, CD19 4,9, CD4+CD8+ 1,4, НСТ спонтанный 21%, НСТ индуцированный 91%, Трес 337×10^5 копий, Крес 67×10^5 копий. Диаскин тест отрицательный. Результаты исследования крови на антинуклеарный фактор, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, антитела к кардиолипину, ревматоидный фактор, антитела к нативной ДНК — отрицательные.

Результат исследования крови на болезнь Помпе, Фабри, Гоше, Ниммана-Пика — отрицательные, активность кислой липазы в пределах референсных значений. Результат тандемной масс-спектрометрии крови на наследственные болезни обмена — отрицательный. Заключение по результату анализа органических кислот в моче методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией: «Повышение концентрации ряда метаболитов, вероятно, вторичного характера, или обусловленное наследственными заболеваниями, в том числе дефицитом пиридоксамина-5-прайм-фосфат-оксидазы».

При инструментальном обследовании при доплерографии выявлен неокклюзионный тромбоз левой подключичной и яремной вены. При рентгенографии нижних конечностей выявлены рентгенологические признаки рахитоподобного заболевания (бокаловидная деформация дистальных отделов бедренных костей со сниже-

нием костной плотности и бахромячатой эпифизарной зоной, бокаловидная деформация проксимального отдела большеберцовых костей и С-образная деформация костей голени слева и справа). При ультразвуковом исследовании (УЗИ) коленных и тазобедренных суставов выявлены признаки синовита левого коленного и правого тазобедренного суставов. При УЗИ органов брюшной полости — гепатоспленомегалия, увеличение мезентериальных лимфоузлов, лёгкое расширение холедоха, нефромегалия, умеренные диффузные изменения почек, отёк стенок чашечно-лоханочной системы справа. При УЗИ вилочковой железы — уменьшение размеров вилочковой железы. Патологических изменений при офтальмологическом исследовании не обнаружено. При магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга с контрастным усилением — множественные субэпендимальные узлы, множественные интрапаренхиматозные узлы в лобной и теменной долях слева. При повторном исследовании в динамике количество узлов уменьшилось, описанные очаги расценены как грибковое поражение головного мозга. По данным МРТ области шеи, грудной клетки, живота, конечностей — дополнительных образований, увеличенных лимфоузлов не выявлено. При эхокардиографии обнаружено увеличение размеров левого желудочка. По данным электроэнцефалографии (ЭЭГ) — умеренные общемозговые нарушения, стадии сна дифференцированы, эпилептиформной активности не зарегистрировано. При проведении ЭЭГ в динамике выявлена региональная эпилептиформная активность: острые волны в левой лобно-центральной области.

При исследовании ДНК методом клинического секвенирования была выявлена мутация с.473_485delCTCTACACAGAGG в гомозиготном варианте в области chr10:6021575ACCTCTGTGTAGAG>A, в гене *IL2RA*, которая ассоциируется с первичным иммунодефицитом с иммунной дисрегуляцией — дефицитом *IL2RA* (Immunodeficiency 41 with lymphoproliferation and autoimmunity, *IL2RA* deficiency, CD25 deficiency, IMD41).

За время нахождения пациента Д. в отделении новорождённых ЧОДКБ сохраняется волнообразное течение эпизодов лихорадки, диареи, патологических потерь со стулом, лабораторных признаков системного воспалительного ответа, менингита по данным ликворограммы. Ребёнок получает частичное энтеральное питание, парентеральное питание и инфузионную терапию, антибактериальную терапию широкого спектра действия, противогрибковую терапию с учётом данных бактериологического исследования, витаминотерапию (токоферола ацетата и холекальциферол), панкреатин, повторные курсы внутривенного иммуноглобулина. В возрасте 5 мес.

ребёнок для дальнейшего лечения был переведен в Клинику Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, после стабилизации состояния пациент Д. переведен в Клинику «НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой» для проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Первая ТГСК была проведена пациенту Д. в возрасте 10 мес., состояние ребёнка оставалось тяжёлым, была начата иммуносупрессивная терапия сиролимусом, в возрасте 12 мес. ребёнку проведена повторная ТГСК, в течение 2 мес. после повторной ТГСК в состоянии ребёнка получена положительная динамика, появилась толерантность к энтеральному питанию, увеличились темпы физического и моторного развития.

Обсуждение результатов

Первый случай дефицита CD25 был описан в 1997 г. N. Sharfe и соавт. (Канада, Торонто) [6] у мальчика, рождённого от двоюродных брата и сестры, с младенческого возраста страдавшего персистирующими вирусными, бактериальными и грибковыми инфекциями, хронической диареей, хроническим заболеванием лёгких, анемией, лимфаденопатией и гепатоспленомегалией, неспособностью отторгнуть аллогенный кожный трансплантат. Анализ ДНК пациента выявил мутации в гене *IL-2RA*. В 2007 г. A. A. Caudy и соавт. (США, Принстон) [3] описали мальчика с IPeX-подобным синдромом с манифестацией с возраста 6 нед. с тяжёлой хронической диареей, экземой, инсулинозависимым диабетом, аутоиммунной гемолитической анемией, гипотериеозом, аутоиммунной нейтропенией, рецидивирующей цитомегаловирусной инфекцией, персистирующими инфекциями дыхательных путей с нормальным геном белка FoxP3 и аутосомно-рецессивными мутациями в гене *IL-2RA*. В 2013 г. K. Goudy и соавт. (Италия, Милан) [7] описали девочку 8 лет рождённую от двоюродных брата и сестры с манифестацией с неонатального периода тяжёлой хронической диареи, требующей частого парентерального питания, и тяжёлой экземы, рецидивирующей цитомегаловирусной инфекцией, аутоиммунным тиреодитом, алопецией, лимфаденопатией, рецидивирующими бактериальными инфекциями, пациентка находилась на комбинированной терапии глюкокортикостероидами и такролимусом, получала повторные многократные курсы антибактериальной и противогрибковой терапии, ганцикловир. Отец и мать пациентки оказались гетерозиготными по мутации в гене *IL-2RA*, которая в гомозиготном варианте была обнаружена при анализе ДНК у пациентки. Трансплантация гемопоэтических стволо-



Уровень С-реактивного белка у пациента Д. за 5 мес. жизни с момента манифестации заболевания.
Level of C-reactive protein in patient D. over 5 months from the moment of manifestation of the disease.

вых клеток была эффективным методом лечения во всех трёх описанных случаях [3, 6, 7]. В 2014 г. L. Velgodnik и соавт. (Аргентина, Буэнос-Айрес) [4] описали дефицит CD25 в результате гомозиготной миссенс-мутации в гене IL-2RA у пациентки 5 лет (усыновленную, без истории родителей) с тяжёлым атопическим дерматитом, манифестировавшим с раннего неонатального периода, хронической диареей, алопецией и рецидивирующими инфекциями нижних и верхних дыхательных путей. Субстратом тяжёлого поражения паренхимы лёгких был облитерирующий бронхиолит с гиперплазией лимфоцитов, на момент публикации пациентка ожидала ТГСК. До конца 2023 г. в литературе описано ещё несколько случаев дефицита CD25, наиболее частыми симптомами у пациентов были тяжёлая диарея, рецидивирующие вирусные, бактериальные, грибковые инфекции, аутоиммунные заболевания. Наиболее распространённой терапевтической стратегией у пациентов с дефицитом CD25 до ТГСК были антибактериальная, противогрибковая, противовирусная и иммуносупрессивная терапия (сиролимус, глюкокортикостероиды) [2, 5, 8, 9]. У представленного нами пациента дефицит CD25 манифестировал упорной диареей в неонатальном периоде, в первые месяцы жизни принявшей упорный, хронический, тяжёлый характер, требующий парентерального питания, с развитием синдрома мальабсорбции, следствием которого стали гипотрофия, клинические и рентгенологические проявления рахитоподобного заболевания, вероятно, в результате нарушения всасывания кальция в желудочно-кишечном тракте. Клиническими проявлениями нарушения противоинфекционной защиты в результате дефицита CD25 у нашего пациента стали идентифицированные методом ПЦР в крови и ликворе рецидивирующие бактериальные, вирусные, грибковые инфекции с поражением кожи, желудочно-кишечного тракта,

центральной нервной системы. Рецидивирующие эпизоды лихорадки и рецидивирующие лабораторные признаки системного воспалительного ответа на фоне антибактериальной, противогрибковой терапии, увеличение мезентериальных лимфоузлов, признаки язвенного терминального илеита по данным колоноскопии, эрозивный бульбит по данным эзофагодуоденоскопии, синовит у нашего пациента, вероятно, были проявлениями нарушения регуляторной функции Т-клеток. На рисунке представлены данные об уровне С-реактивного белка у нашего пациента с начала манифестации заболевания в неонатальном периоде и до возраста 5 мес.

Как показано на рисунке, уровень С-реактивного белка у нашего пациента как проявление системного воспалительного ответа колеблется в значительных пределах имея пики, достигающие более 100 мг/л, имеющие место на фоне проведения антибактериальной, противогрибковой терапии. Уровень С-реактивного белка в течение 5 мес. жизни практически не достигает нормальных значений, что свидетельствует о постоянной активации системного воспалительного ответа, связанного, вероятно, как с ответом на инфекционные факторы, так и с нарушением иммунологической толерантности.

Следует отметить, что спектр заболеваний с нарушением иммунной регуляции по мере появления новых данных, связанных с анализом различных фенотипов первичных нарушений иммунной регуляции и результатами анализа ДНК, значительно расширился в последние годы, и включает в себя различные аутоиммунные, аутовоспалительные, лимфопролиферативные синдромы в сочетании со злокачественными новообразованиями и аллергическими проявлениями. Учитывая разнообразие фенотипов и неполное проявление всех признаков первичного нарушения иммунной регуляции у конкретного

индивидуума, клиницисты испытывают значительные сложности как в диагностике, так и в ведении пациентов с первичным нарушением иммунной регуляции, поскольку ТГСК может быть отсрочена из-за длительного процесса подготовки, до ТГСК клиницисту необходимо выдерживать баланс между высоким инфекционным риском и необходимостью иммуносупрессивной терапии, процедура ТГСК для пациента имеет свои риски, в том числе связанные с развитием реакции «трансплантат против хозяина» [10]. Особые трудности в диагностике первичных нарушений иммунной регуляции имеют место у пациентов первых месяцев жизни в силу неспецифичности клинических проявлений разнообразных заболеваний. В нашем случае клинические проявления у пациента Д. в первые два месяца жизни расценивались как генерализованное инфекционное заболевание, отсутствие эффекта от длительной массивной антибактериальной и противогрибковой терапии позволило предположить наличие у ребенка первичного иммунодефицита. Отсутствие значительных отклонений в количественных показателях иммунограммы в случае дефицита CD25 также затрудняет диагностику данного первичного иммунодефицита и требует проведения развернутых иммунологических тестов и молекулярно-генетического исследования, требующего времени для его выполнения. В нашем случае с момента манифестации и до установления диагноза первичного иммунодефицита с иммунной дисрегуляцией прошло около 5 мес., в отсутствие уточнённого диагноза у нашего пациента коридор терапевтических возможностей мог включать только антибактериальную, противогрибковую терапию, терапию внутривенным иммуноглобулином, коррекцию функции желудочно-кишечного тракта — парентеральное питание, инфузионная терапия, требующая катетеризации центральных вен и в свою очередь ставшая фактором риска тромбоза верхней полой вены и её ветвей на фоне постоянной активации системного воспалительного ответа.

Ограничения в исследовании

На момент написания статьи результат повторной ТГСК у пациента Д. пока не ясен, нет данных исследования ДНК родителей пациента Д.

Литература/References

1. Tangye S.G., Al-Herz W., Bousfiha A., Cunningham-Rundles C., Franco J.L., Holland S.M., Klein C., Morio T., Oksenhendler E., Picard C., Puel A., Puck J., Seppänen M.R.J., Somech R., Su H.C., Sullivan K.E., Torgerson T.R., Meyts I. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2022 Oct; 42 (7): 1473–1507. doi: 10.1007/s10875-022-01289-3.
2. Vignoli M., Ciullini Mannurita S., Fioravanti A., Tumino M., Grassi A., Guariso G., Favre C., D'Elia M.M., Gambineri E. CD25 deficiency: A new conformational mutation prevents the receptor expression on cell surface. *Clin Immunol.* 2019 Apr; 201: 15–19. doi: 10.1016/j.clim.2019.02.003.

Заключение

Дефицит CD25 является редким первичным иммунодефицитом с иммунной дисрегуляцией. Дефицит CD25 следует заподозрить у пациентов на основании характерных клинических проявлений. Наиболее частым и ранним симптомом дефицита CD25 является тяжёлая хроническая диарея. Поражение кожи (экзема) и восприимчивость к цитомегаловирусной инфекции также являются ранними симптомами дефицита CD25. Ранняя диагностика дефицита CD25 может улучшить прогноз и качество жизни пациентов. Исследование ДНК методом клинического секвенирования позволяет подтвердить диагноз дефицита CD25. Представление и объединение данных по дефициту CD25 необходимо для лучшего понимания проявлений и особенностей естественного течения данной патологии.

Благодарности

Коллектив авторов признателен врачам ГАУЗ «Городская клиническая больница № 9» г. Челябинска, врачам ГАУЗ «Челябинская областная детская клиническая больница», врачам Клиники Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета и Клиники «НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой» г. Санкт-Петербурга, проводившим лабораторные, инструментальные исследования, лечение пациента с редким первичным иммунодефицитом с иммунной дисрегуляцией с верой и надеждой на благоприятный исход.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Участие авторов. Е. Н. Серебрякова — написание текста, редактирование, финальное утверждение рукописи; Т. В. Шилова — редактирование текста, предоставление материалов генетического исследования; А. С. Кожевников — наблюдение за пациентом, сбор данных; Э. И. Кильмухаметова — наблюдение за пациентом, сбор данных.

3. Caudy A.A., Reddy S.T., Chatila T., Atkinson J.P., Verbsky J.W. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Feb; 119 (2): 482–487. doi: 10.1016/j.jaci.2006.10.007.
4. Bezrodnik L., Caldirola M.S., Seminario A.G., Moreira I., Gaillard M.I. Follicular bronchiolitis as phenotype associated with CD25 deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2014 Feb; 175 (2): 227–234. doi: 10.1111/cei.12214.
5. Lai N., Liu L., Lin L., Cui C., Wang Y., Min Q., Xiong E., Wang W., Ying W., Zhou Q., Hou J., Sun J., Wang J.Y., Wang X. Effective and safe treatment of a novel IL2RA deficiency with rapamycin. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020 Mar; 8 (3): 1132–1135.e4. doi: 10.1016/j.jaip.2019.09.027.

6. Sharfe N., Dadi H.K., Shahar M., Roifman C.M. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1; 94 (7): 3168–3171. doi: 10.1073/pnas.94.7.3168.
7. Goudy K., Aydin D., Barzaghi F., Gambineri E., Vignoli M., Ciullini Mannurita S., Doglioni C., Ponzoni M., Cicalese M.P., Assanelli A., Tommasini A., Brigida I., Dellepiane R.M., Martino S., Olek S., Aiuti A., Ciceri F., Roncarolo M.G., Bacchetta R. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2013 Mar; 146 (3): 248–261. doi: 10.1016/j.clim.2013.01.004
8. Baş Z., Bayraktutar B.N., Uçakhan Ö.Ö. Severe Dry Eye in CD25 Deficiency Syndrome. *Eye Contact Lens*. 2018 Jan; 44 (1): e1–e3. doi: 10.1097/ICL.0000000000000346.
9. Waheed N., Naseer M., Haider N., Suleman S., Ullah A. Whole exome sequencing identified a novel splice donor site variant in interleukin 2 receptor alpha chain. *Immunogenetics*. 2023 Apr; 75 (2): 71–79. doi: 10.1007/s00251-022-01278-1.
10. Tsilifis C., Slatter M.A., Gennerly A.R. Too much of a good thing: a review of primary immune regulatory disorders. *Front Immunol*. 2023 Oct 31; 14: 1279201. doi: 10.3389/fimmu.2023.1279201.

Поступила / Received 02.02.2024

Принята в печать / Accepted 03.03.2024

Информация об авторах

Серебрякова Елена Николаевна — д. м. н., профессор кафедры госпитальной педиатрии; декан факультета клинической психологии, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-4692-4802. ResearcherID: ABG-8330-2021. eLIBRARY SPIN-код: 8613-5714. Scopus Author ID: 36020648000

Шилова Татьяна Васильевна — к. м. н., доцент кафедры госпитальной педиатрии; декан педиатрического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9826-9654. ResearcherID: JZS-8764-2024. eLIBRARY SPIN-код: 2028-9392. Scopus Author ID: 57211799427

Кожевников Артем Сергеевич — старший лаборант кафедры госпитальной педиатрии, ординатор второго года обучения по специальности Неонатология, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия. ORCID ID: 0009-0008-5400-3043. ResearcherID: RID72103. eLIBRARY SPIN-код: 9614-1388. Scopus Author ID: 58103491300

Кильмухаметова Элина Ильясовна — студентка 6 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России; медицинская сестра отделения новорожденных ГАУЗ Челябинская областная детская клиническая больница, Челябинск, Россия. ORCID ID: 0009-0005-3745-9514. ResearcherID: RID72101. eLIBRARY SPIN-код: 2540-3490

About the authors

Elena N. Serebryakova — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Hospital Pediatrics; Dean of the Faculty of Clinical Psychology, South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-4692-4802. ResearcherID: ABG-8330-2021. eLIBRARY SPIN code: 8613-5714. Scopus Author ID: 36020648000

Tatiana V. Shilova — Ph. D. in Medicine, Associate Professor at the Department of Hospital Pediatrics, Dean of the Faculty of Pediatrics, South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. ORCID ID: 0000-0001-9826-9654. ResearcherID: JZS-8764-2024. eLIBRARY SPIN code: 2028-9392. Scopus Author ID: 57211799427

Artem S. Kozhevnikov — Senior laboratory assistant at the Department of Hospital Pediatrics; Second-year resident majoring in Neonatology, South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia. ORCID ID: 0009-0008-5400-3043. ResearcherID: RID72103. eLIBRARY SPIN code: 9614-1388. Scopus Author ID: 58103491300

Elina I. Kilmukhametova — 6th year student of the Pediatric Faculty of the South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Nurse of the Neonatal Department of the Chelyabinsk Regional Children's Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia. ORCID ID: 0009-0005-3745-9514. ResearcherID: RID72101. eLIBRARY SPIN code: 2540-3490

Показатели цитокиновых маркеров у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Д. Х. КУШХОВА, *З. А. КАМБАЧОКОВА, С. И. МИЗИЕВ,
Х. А. ТЕМИРСУЛТАНОВА, М. В. МАХМАЕВА, А. Х. ХАЦУКОВА,
С. М. БАХАЛАЕВА, Д. Р. АРЦХАЕВА, М. Р. КУШХОВ, Д. З. СОБЛИРОВА,
Ф. Х. КАРОВА, А. Ч. МАМХЕГОВА

Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Резюме

Было проведено исследование показателей интерлейкина-1 β , интерлейкина-10 и лиганда CD40 (CD40L) у пациентов с артериальной гипертензией (АГ), ишемической болезнью сердца (ИБС), в том числе с нарушением ритма сердца (НРС). Обследовано 90 пациентов, разделённых на 3 группы (АГ, ИБС, ИБС+НРС). Результаты исследования продемонстрировали возможное участие в развитии АГ воспалительного цитокина — интерлейкина-1, уровень которого в нашем исследовании значительно увеличивался по мере присоединения таких кардиоваскулярных осложнений, как сердечная недостаточность, ИБС, в том числе осложнённых НРС.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца; артериальная гипертензия; нарушение ритма сердца; интерлейкин-1 β ; интерлейкин-10; CD40L

Для цитирования: Кушхова Д. Х., Камбачокова З. А., Мизиев С. И., Темирсултанова Х. А., Махмаева М. В., Хацуква А. Х., Бахалаева С. М., Арцхаева Д. Р., Кушхов М. Р., Соблирова Д. З., Карова Ф. Х., Мамхегова А. Ч. Показатели цитокиновых маркеров у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (3–4): 58–61. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-58-61>. EDN: VNUYPK.

Indicators of Cytokine Markers in Patients with Cardiovascular Diseases

DIANA H. KUSHKHOVA, *ZARETA A. KAMBACHOKOVA,
SULEIMAN I. MIZIEV, KHAVA A. TEMIRSULTANOVA, MAKKA V. MAKHMAEVA,
ALINA H. KHATSUKOVA, SELIMA M. BAKHALAEVA, DANA R. ARTSKHAEVA,
MURAT R. KUSHKHOV, DIANA Z. SOBLIROVA,
FARDAUS H. KAROVA, AIZA CH. MAMHEGOVA

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

Abstract

A study of interleukin-1 β , interleukin-10, and CD40 ligand (CD40L) parameters in patients with arterial hypertension (AH), coronary heart disease (CHD), including cardiac arrhythmias (CA), was carried out. The study included 90 patients, divided into 3 groups (AH, CHD, CHD + CA). The results of the study demonstrated the possible involvement of an inflammatory cytokine, interleukin-1, in the development of AH, the level of which in our study significantly increased with the addition of such cardiovascular complications as heart failure (HF), CHD, including CHD with CA.

Keywords: coronary heart disease, arterial hypertension, cardiac arrhythmias, interleukin-1 β , interleukin-10, CD40L.

For citation: Kushkhova D. H., Kambachokova Z. A., Miziev S. I., Temirsultanova H. A., Makhmaeva M. V., Khatsukova A. H., Bakhalaeva S. M., Artskhaeva D. R., Kushkhov M. R., Soblirova D. Z., Karova F. H., Mamhegova A. Ch. Indicators of cytokine markers in patients with cardiovascular diseases. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (3–4): 58–61. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-58-61>. EDN: VNUYPK.

Актуальность

Согласно современным представлениям, непосредственную роль в патогенезе некоторых заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССС) [1–7], та-

ких как атеросклероз, сердечная недостаточность, сахарный диабет, играет системная воспалительная активность, о чём свидетельствует повышение содержания воспалительных маркеров в сыво-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: k.zareta.7@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: k.zareta.7@mail.ru



ротке крови [8–11]. Для практикующих врачей и исследователей в настоящее время серьёзной проблемой является частое присоединение осложнений в виде нарушений ритма сердца (НРС). Так, фибрилляция предсердий является одним из наиболее часто встречающихся НРС и составляющая 30 % от всех аритмий [8, 12, 13]. Возможность участия в развитии и прогрессировании НРС изученных иммуновоспалительных маркеров и дало основание к проведению данного исследования.

Цель работы — исследование уровней провоспалительного цитокина — интерлейкина-1 β , противовоспалительного цитокина — интерлейкин-10 и лиганда CD40 (CD40L) у пациентов с артериальной гипертензией, ишемической болезнью сердца и нарушением ритма сердца.

Материал и методы

Обследовано 90 пациентов (47 мужчин и 43 женщины, средний возраст 57 \pm 10 лет, разделённых на 3 группы (АГ, ИБС, ИБС+НРС). Первую группу составили 30 пациентов с АГ (17 мужчин и 13 женщин, средний возраст 56 \pm 9). Вторую группу составили 29 больных с ИБС (15 мужчин и 14 женщин, средний возраст 57 \pm 10). Третью группу составил 31 пациент с ИБС и НРС (15 мужчин и 16 женщин, средний возраст 57 \pm 9). Контрольную группу составили 20 соматически здоровых лиц (10 мужчин, 10 женщин, средний возраст 55 \pm 10 лет). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. В обследование не включали больных с уровнем гликозилированного гемоглобина более 10%, анемией, почечной недостаточностью, острым коронарным синдромом в течение предшествующих 3 мес., воспалительными заболеваниями в стадии обострения, окклюзирующими заболеваниями сосудов нижних конечностей. В комплекс инструментальных методов входили: рентгенография органов грудной клетки с верификацией признаков венозного застоя в лёгких, эхокардиография, тест 6-минутной ходьбы, электрокардиография. Интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β) и интерлейкин-10 (ИЛ-10) определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом с помощью тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (Россия). Статистический анализ проводился с использованием программы статистической обработки данных STATISTICA 9 (StatSoft Inc, США).

Таблица 1. Показатели уровня ИЛ-1 β и ИЛ-10 у пациентов в группах

Table 1. Levels of IL-1 β and IL-10 in different groups of patients

Показатель	1-я группа АГ n=30	2-я группа ИБС n=29	3-я группа ИБС+НРС n=31	4-я группа (здоровые) n=20
Интерлейкин 1 β (пг/мл)	78,9 \pm 3,3*	80,9 \pm 4,2*	99,8 \pm 9,0**	15,0 \pm 3,0##
Интерлейкин 10 (пг/мл)	50,2 \pm 3,4* ¹	56,7 \pm 3,4* ¹	71,5 \pm 5,7**	10,0 \pm 3,0## ¹¹
Интерлейкин 1 β	1,6 \pm 0,7	1,4 \pm 0,8	1,4 \pm 0,7	1,4 \pm 0,2
Интерлейкин 10 (пг/мл)				

Примечание. * — различия достоверны по отношению к показателям 4-й группы сравнения — здоровых ($p<0,001$); # — различия достоверны по отношению к показателям 1-й группы — пациентов с АГ ($p<0,05$); ## — различия достоверны по отношению к показателям 3-й группы — пациентов с ИБС и НРС ($p<0,001$); ¹ — различия достоверны по отношению к показателям 3-й группы — пациентов с ИБС и НРС ($p<0,05$); ¹¹ — различия достоверны по отношению к показателям 3-й группы — пациентов с ИБС и НРС ($p<0,001$).

Note. * — the differences are significant in relation to the indicators of the 4th comparison group — healthy individuals ($P<0.001$); # — differences are significant in relation to the indicators of the 1st group — patients with hypertension ($P<0.05$); ## — the differences are significant in relation to the indicators of the 1st group — patients with hypertension ($P<0.001$); ¹ — the differences are significant in relation to the indicators of the 3rd group — patients with coronary artery disease and NRS ($P<0.05$); ¹¹ — the differences are significant in relation to the indicators of the 3rd group — patients with CHD and CA ($P<0.001$).

Результаты и обсуждение

При исследовании цитокинов у больных в группах было выявлено, что у всех пациентов в группах отмечалось выраженное статистически значимое увеличение показателей ИЛ-1 β и ИЛ-10 по сравнению с таковыми в контрольной группе ($p<0,001$) (табл. 1). При оценке значений ИЛ-1 β в группах было выявлено, что у больных с ИБС и ИБС с НРС (2-я и 3-я группы, соответственно) отмечались более высокие показатели (80,9 \pm 4,2 пг/мл — во 2-й группе и 99,8 \pm 9,0 пг/мл — в 3-й группе), по сравнению с пациентами с АГ из 1-й группы (78,9 \pm 3,3 пг/мл), причём в 3-й группе эти изменения были достоверными ($p<0,05$) (см. табл. 1).

При оценке значений ИЛ-10 в группах было выявлено, что у больных с ИБС и ИБС+НРС (2-я и 3-я группы, соответственно) отмечались более высокие показатели ИЛ-10 (56,7 \pm 3,4 пг/мл во 2-й группе и 71,5 \pm 5,7 пг/мл — в 3-й группе) по сравнению с пациентами с АГ из 1-й группы (50,2 \pm 3,4 пг/мл), причём в 3-й группе эти изменения были достоверными ($p<0,05$) (см. табл. 1).

В данном аспекте, исследование значений лиганда CD40 (CD40L) представлялось актуальным, поскольку маркер экспрессируется активированными Т-хелперными клетками. Предполагается, что sCD40L является потенциальным индикатором риска развития ССЗ. Его уровень повышен при ИМ, сердечной недостаточности, инсульте [1]. При оценке значений CD40L в группах было выявлено, что у больных с ИБС и ИБС с НРС (2-я и 3-я группы, соответственно) отмечались достоверно более высокие показатели (табл. 2).

Выводы

1. Уровни провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β и противовоспалительного ци-

Таблица 2. Показатели уровня CD40L у пациентов в группах

Table 2. CD40L levels in different groups of patients

Показатель	1-я группа (АГ) n=30	2-я группа (ИБС) n=29	3-я группа (ИБС+НРС) n=31	4-я группа (здоровые) n=20
CD40L, пг/мл	78±24*	171±26**#	332±48***##	32±12

Примечание. * — различия достоверны по отношению к показателям 4-й группы сравнения — здоровых ($p < 0,05$); ** — различия достоверны по отношению к показателям 4-й группы сравнения — здоровых ($p < 0,01$); *** — различия достоверны по отношению к показателям 4-й группы сравнения — здоровых ($p < 0,001$); # — различия достоверны по отношению к показателям 1-й группы — пациентов с АГ ($p < 0,01$); ## — различия достоверны по отношению к показателям 1-й группы — пациентов с АГ ($p < 0,001$).

Note: * — the differences are significant in relation to the indicators of the 4th comparison group — healthy individuals ($P < 0.05$); ** — the differences are significant in relation to the indicators of the 4th comparison group — healthy individuals ($P < 0.01$); *** — differences are significant in relation to the indicators of the 4th comparison group — healthy individuals ($P < 0.001$); # — differences are significant in relation to the indicators of the 1st group — patients with hypertension ($P < 0.01$); ## — the differences are significant in relation to the indicators of the 1st group — patients with hypertension ($P < 0.001$).

токаина интерлейкина-10 были значительно повышены у пациентов с артериальной гипертензией, ишемической болезнью сердца и нарушением сердечного ритма по сравнению с данными показателями у здоровых лиц.

2. Уровень провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β был достоверно выше у больных с ишемической болезнью сердца и нарушением ритма сердца и достоверно снижался у пациентов с артериальной гипертензией.

3. Показатель противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 был выше у пациентов с ишемической болезнью сердца и нарушением ритма сердца по сравнению с данными показателями у здоровых лиц и пациентов с АГ.

4. Показатель лиганда CD40 (CD40L) был достоверно выше у пациентов ишемической болезнью сердца, в том числе, сопровождающейся

нарушением сердечного ритма, тогда как у лиц с АГ также наблюдалось повышение данного параметра в сравнении с группой здоровых.

Заключение

Таким образом, создаётся патофизиологическая цепь неблагоприятного течения АГ, которую необходимо учитывать в комплексной терапии, а показатели цитокинов использовать в качестве диагностических и прогностических маркеров. Результаты проведённого исследования демонстрируют участие компонентов воспаления в патогенезе нарушений сердечного ритма, что существенно помогает расширить научные представления о механизмах их возникновения для разработки новых терапевтических подходов.

Литература/References

1. Adawi A., Zhang Y., Baggs R. et al. Disruption of the CD40-CD40l system prevents an oxygen-induced distress syndrome. *Am J Pathol.* 1998; 152 (3): 651-657.
2. Amir O., Rogowski O., David M. et al. Circulating interleukin-10: association with higher mortality in systolic heart failure patients with elevated tumor necrosis factor- α . *Isr Med Assoc J.* 2010; 12(3): 158-162.
3. Miettinen K.H., Lassus J., Harjola V.P. et al. Prognostic role of pro- and anti-inflammatory cytokines and their polymorphisms in acute decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2008; 10 (4): 396-403. doi: 10.1016/j.ejheart.2008.02.008.
4. Myrjanthejs P.M., Lazaris N., Venetsanou K. et al. Immune status evaluation of patients with chronic heart failure. *Cytokine.* 2007; 37 (2): 150-154. doi: 10.1016/j.cyto.2007.03.007.
5. Oikonomou E., Tousoulis D., Siasos G. et al. The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches. *Hellenic J Cardiol.* 2011; 52 (1): 30-40.
6. Pasqui A.L., Di Renzo M., Maffei S. et al. Pro/anti-inflammatory cytokine imbalance in postischemic left ventricular remodeling. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010: 974694. doi: 10.1155/2010/974694.
7. Pierson W., Liston A. A new role for interleukin-10 in immunoregulation. *Immunol Cell Biol.* 2010; 88 (8): 769-770. doi: 10.1038/icb.2010.105.
8. Kalogeropoulos A.P., Georgiopoulou V.V., Butler J. From risk factors to structural heart disease: the role of inflammation. *Heart Fail Clin.* 2012; 8 (1): 113-123. doi: 10.1016/j.hfc.2011.08.002.
9. Kaur K., Dhingra S., Slezak J. et al. Biology of TNF α and IL-10, and their imbalance in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2009; 14 (2): 113-123. doi: 10.1007/s10741-008-9104-z.
10. Kooten C., Banchereau J. CD40-CD40ligand / C. Kooten, J. Banchereau. *J Leukocyte Biology.* 2000; 2-13.
11. Lindberg E., Magnusson Y., Karason K., Andersson B. Lower levels of the host protective IL-10 in DCM—a feature of autoimmune pathogenesis? *Autoimmunity.* 2008; 41 (6): 478-483. doi: 10.1080/08916930802031645.
12. Дедкова А.А., Кологривова И.В., Сулова Т.Е., Баталов Р.Е., Борисова Е.В. Значение процессов воспаления в патогенезе фибрилляции предсердий у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Сибирский медицинский журнал.* 2015; 30(1): 40-43. [Dedkova A.A., Kologrivova I.V., Suslova T.E., Batalov R.E., Borisova E.V. Znachenie protsessov vospaleniya v patogeneze fibrillyatsii predserdij u patientsov s ishemicheskoj bolezn'ju serdtsa. *Sibirskij Meditsinskij Zhurnal.* 2015; 30(1): 40-43. (in Russian)]
13. Heymans S., Hirsch E., Anker S.D. et al. Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* 2009; 11 (2): 119-129. doi: 10.1093/eurjhf/hfn043.

Поступила / Received 29.03.2024
Принята в печать / Accepted 10.04.2024

Информация об авторах

Кушхова Диана Хабасовна — студентка 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Камбачокова Зарета Анатольевна — профессор кафедры госпитальной терапии Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Мизиев Сулейман Ибрагимович — студент 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Темирсултанова Хава Аббасовна — студентка 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Махмаева Макка Висхановна — студентка 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Хацуква Алина Хабилловна — студентка 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Бахалаева Селима Магомедовна — студентка 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Арихаева Дана Руслановна — студентка 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Соблирова Диана Зауровна — студентка 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Кушхов Мурат Русланович — студент 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Карова Фардаус Хамидбиевна — студентка 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

Мамхегова Айза Чаримовна — студентка 6 курса по специальности «Лечебное дело» Медицинской академии Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия

About the authors

Diana Kh. Kushkhova — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Zareta A. Kambachokova — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Hospital Therapy, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Suleiman I. Miziev — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Khava A. Temirsultanova — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Makka V. Makhmaeva — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Alina Kh. Khatsukova — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Selima M. Bakhalaeva — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Dana R. Artskhaeva — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Diana Z. Soblirova — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Murat R. Kushkhov — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Fardaus Kh. Karova — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Aiza Ch. Mamkhegova — 6th year student majoring in General Medicine, Medical Academy, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Нанокапсулированные системы: перспективные биомедицинские инициативы в фармакологии

Г. Н. ГЕНАТУЛЛИНА, *А. Л. ЯСЕНЯВСКАЯ, А. А. ЦИБИЗОВА, М. А. САМОТРУЕВА

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

Резюме

Важнейшим направлением современной фармакологии является исследование систем, используемых для контролируемой и целенаправленной адресной доставки лекарственных препаратов, которое реализуется путём создания нанокапсулированных форм, имеющих различную природу и химическое строение. Нанокапсулирование — перспективный метод создания инновационных лекарственных форм с пролонгированным действием, позволяющий расширить номенклатуру лекарственных средств и изменить подходы к лечению различных заболеваний, требующих длительной терапии. В данном обзоре представлена информация, освещающая наиболее перспективные классы наноразмерных носителей лекарственных средств, описаны технологические процессы их получения на основе липидов, полимеров и биodeградируемых минеральных веществ, а также приведены примеры использования в современной фармацевтической практике.

Ключевые слова: нанокапсулированные системы; направленная доставка; лекарственный препарат; нанофармакология

Для цитирования: Генатуллина Г. Н., Ясенявская А. Л., Цибизова А. А., Самотруева М. А. Нанокапсулированные системы: перспективные биомедицинские инициативы в фармакологии. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (3–4): 62–72. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-62-72>. EDN: GNCNIG.

Nanoencapsulated Systems: Promising Biomedical Initiatives in Pharmacology

GUZEL N. GENATULLINA, *ANNA L. YASENYAVSKAYA, ALEXANDRA A. TSIBIZOVA, MARINA A. SAMOTRUEVA

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

Abstract

The most important direction of modern pharmacology is the study of systems used for controlled and targeted delivery of medications, which is carried out by creating nanoencapsulated forms of different nature and chemical structure. Nanoencapsulation is a promising method for creating innovative dosage forms with prolonged action, which allows expanding the range of medications, as well as changing approaches to various diseases that require long-term therapy. This review provides information highlighting the most promising classes of nanosized drug carriers, describes the processes of their use based on lipids, polymers, and biodegradable mineral substances, as well as provides examples of their use in modern pharmaceutical practice.

Keywords: nanocapsulated systems, targeted drug delivery, nanopharmacology.

For citation: Genatullina G. N., Yasyenyavskaya A. L., Tsibizova A. A., Samotrueva M. A. Nanoencapsulated systems: promising biomedical initiatives in pharmacology. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (3–4): 62–72. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-62-72>. EDN: GNCNIG.

В последние годы нанотехнологические принципы создания инновационных продуктов всё более активно используются для решения большого спектра задач в биомедицинской и фармацевтической отраслях. Актуальным и перспективным направлением современной фармакологии является разработка и исследование лекарственных средств с контролируемым

высвобождением активных молекул посредством создания эффективных систем доставки. В качестве универсальной системы доставки различных лекарственных веществ, в том числе гидрофобных, гидрофильных и амфифильных соединений, рассматриваются наночастицы, высвобождение из которых может происходить как с поверхности, так и из всего объёма в результате дезинтег-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: yasen_9@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: yasen_9@mail.ru



рации [1–3]. Многообразие фармацевтических наноматериалов отражено в классификациях, основанных на различных характеристиках:

— по размеру: молекулярные кластеры (менее 10 атомов, с диаметром частиц меньше 1 нм); кластеры твёрдого тела (от 10^2 до 10^3 атомов, с диаметром частиц от 1 до 5 нм); микрокристаллы (от 10^3 до 10^4 атомов, с диаметром частиц от 5 до 7 нм); частицы компактного вещества (более 10^5 атомов, с диаметром частиц больше 7 нм) [4]. Другие источники придерживаются распределения частиц на три категории: 1–10 нм, 10–50 нм и 50–100 нм [3].

— по форме: сферические (липосомы, фуллерены), пластинчатые и трубчатые (нанотрубки).

— по химическому составу: металлические (золото, серебро, железо, медь и др.), оксидные (TiO_2 , SiO_2 , FeO и др.), полимерные (полиэтиленгликоль, полигликолевая и полимолочная кислоты), углеродные (графен, нанодиазены и др.), биологические и биогенные (ферменты, белки, рибосомы, вирусы) магнитные наночастицы [5].

— по внутреннему строению основы: аморфные (микроэмульсии, полимерные мицеллы и др.) и кристаллические (циклодекстрины и др.) [3].

— в зависимости от целостности структуры: стабильные или нестабильные [6].

Технологический процесс, направленный на разработку наночастиц, предназначенных для доставки лекарств, связан с переходом с микрометрического поля на нанометрическое [2]. Важным фактором, влияющим на функциональные характеристики систем доставки, является наноразмер частиц носителя, позволяющий оптимизировать

транспорт лекарственного вещества, оказывая адресное высвобождение внутри клеток-мишеней, и, следовательно, повышать их биодоступность по сравнению с пассивными системами доставки микроразмерного объёма [5]. По мнению ряда исследователей, наиболее эффективными носителями биологически активных веществ считаются наносистемы размером менее 100 нм [7, 8]. Получение необходимого размера частиц обусловлено выбором технологии инкапсулирования веществ, применяемых для разработки системы адресной доставки с учётом их структурно-функциональных свойств.

На сегодняшний день для создания наночастиц и инкапсулирования активных действующих веществ используются ряд методов, представленных в таблице. Наиболее распространённой технологией инкапсулирования биологически активных соединений, широко применяемой в фармации является, как правило, эмульгирование, основанное на нисходящем и восходящем подходах. Методы нисходящего подхода включают преобразование крупных частиц в наноструктуры путём уменьшения размера за счёт внешних механических воздействий, в том числе гомогенизацию под высоким давлением и микрофлюидизацию [16]. Недостатком данного подхода является отсутствие возможности контроля размера частиц и структуры полученной эмульсии, в связи с чем он подходит для ограниченного типа систем [2]. Между тем, нисходящий подход широко используется в качестве подготовительных стадий для других методов инкапсулирования, например, распылительная сушка, комплексная

Методы нанокапсулирования активных веществ

Nanoencapsulation methods for active substances

Методы	Описание	Нанокапсулирование	Источник
Эмульгирование	Смешивание двух несмешивающихся растворителей с образованием эмульсии	Витамин Е, инкапсулированный Tween-80; Ванилин инкапсулирован в наночастицы полимолочной кислоты	[9, 10]
Сушка распылением	Получение порошков с микрокапсулами из жидких капель, содержащих биологически активные соединения под действием горячего воздуха и циклона	Куркумин инкапсулированный хитозаном/Tween 20	[10]
Сублимационная сушка	Удаление влаги путём замораживания воды, содержащейся в растворе или суспензии с последующим выпариванием	Рыбий жир, инкапсулированный поликапролактоном и Pluronic F68	[11]
Экструзия	Введение нового соединения для ускорения гелеобразования и получения плотной системы капсулирования	Масла из семян, инкапсулированные альгинатом натрия и метоксилпектином	[12]
Коацервация	Образование эмульсии путём электростатического притяжения между противоположно заряженными молекулами	Фолиевая кислота, инкапсулированная наночастицами казеина	[13]
Электроформование и электрораспыление	Электрогидродинамические способы распыления полимера с целью получения нановолокон или наночастиц	Масло семян шиповника и β -каротин, инкапсулированная наночастицами проламина	[14, 15]

коацервация, экструзия, электроформование и электрораспыление, позволяющие получать наночастицы с заданными свойствами [17]. Восходящий подход обычно включает самосборку, инверсию фаз и спонтанное эмульгирование, на которые влияют такие факторы, как pH, температура, концентрация веществ и ионная сила. Указанный подход, в отличие от нисходящего, не требует большого количества стабилизаторов и может использоваться с разнообразными типами липидов и поверхностно-активных веществ [18]. Были предложены различные методы инкапсулирования, но ни один из них не считается универсальным [19]. Наилучшей стратегией является выбор метода, учитывающий свойства основного соединения и инкапсулированного материала, включающие их молекулярную массу, полярность, растворимость и распределение частиц по объёму капсулы.

Основные стратегии нанокapsулирования активных веществ

Нанокapsулирование на сегодняшний день перспективно для решения многих проблем, в частности, повышение стабильности активных веществ при хранении, улучшение органолептических характеристик, высвобождение активного соединения с контролируемой скоростью [20, 21]. В зависимости от различных инкапсулирующих материалов наноносители подразделяются на две группы: на липидной основе и на основе полимеров. Помимо этого, нанокapsулирование части лекарственных средств может быть реализовано с помощью биодеградируемых минеральных веществ.

1. Нанокapsулирование на основе биополимеров. Биополимеры широко используются в качестве основного материала для получения оболочки нанокapsул. Существуют различные источники биополимеров, которые могут быть использованы в исходной или модифицированной форме для обеспечения заданных свойств, например, стабильности и пролонгирования терапевтического действия. В целом, активные вещества могут быть инкапсулированы в пищевые биополимеры, такие как белки (сывороточный протеин, казеин, зеин, желатин и др.) и полисахариды (крахмал, хитозан, циклодекстрин и др.) [2]. В процессе нанокapsулирования на основе биополимеров можно получить нанокapsулы или наночастицы. В нанокapsулах ядро окружено полимерной мембраной, в то время как в наночастицах ядро диспергировано в полимерной матрице [2, 21]. Для создания нанокapsул обычно применяют разнообразные технологии, включая комплексную коацервацию [21], сублимационную

и распылительную сушку [11, 12], а также ионное гелеобразование [21]. Наноструктурные системы доставки лекарств на основе полимеров технологически быстро воспроизводятся в больших количествах, могут инкапсулировать различные вещества как гидрофильные, так и гидрофобные, способны регулировать накопление активного вещества в различных органах и тканях организма, увеличивать терапевтическое действие лекарственного препарата и снижать побочные эффекты.

1.1. Биополимеры на основе полисахаридов.

Биополимеры на основе полисахаридов, в зависимости от количества и типов моносахаридных единиц образуют цепочки и могут быть классифицированы как гомополисахариды или гетерополисахариды. Из-за разнообразных химических свойств моносахаридных звеньев, полисахариды обладают разной степенью полимеризации, молекулярной массой, гидрофобностью/гидрофильностью, электростатическим зарядом, вязкостью и способностью к гелеобразованию. Полисахариды, такие как β -циклодекстрин, хитозан, крахмал, используемые для инкапсулирования, имеют малую токсичность и низкую стоимость, высокую стабильность в широком диапазоне pH и хорошую биоразлагаемость [5].

Циклодекстрины — это циклические олигосахариды, имеющие форму усечённого конуса и часто используемые в процессе создания нанокapsул [2]. Внутренняя часть β -циклодекстрина представляет собой полость, образованную комбинацией гидрофобной эпоксидной группы и связи C-H, а внешнее гидрофильное кольцо представлено первичной спиртовой гидроксильной группой на C6. Несмотря на то, что β -циклодекстрины и их комплексы являются гидрофильными, их растворимость в воде незначительна. Причина этого факта связана с высокой энергией кристаллической решётки [2, 22], а также с внутримолекулярными водородными связями, которые препятствуют взаимодействию с молекулами воды (сольватации) [22]. Преимуществами нанокapsул, полученных с использованием β -циклодекстрина, является способность образовывать комплекс сразу с несколькими действующими веществами и замедлять фотохимические реакции и процессы окисления. Установлено, что β -циклодекстрин может быть использован в качестве криопротектора для получения нанокapsулы эвгенола методом диффузии эмульсии [23]. Показано, что фармакокинетические параметры лекарственных веществ не изменяются после их совместного введения с производными β -циклодекстрина [24]. Перспективным является использование циклодекстринов для образования комплексов с гидрофобными витаминами группы A, D, E, которые обычно применяются лишь в форме масляных растворов [25].

Хитозан — это перспективный и доступный катионный полисахарид природного происхождения, который получают путём деацетилирования хитина [26]. Хитозан используют для приготовления наносистем с учётом его биоразлагаемости, чувствительности к pH и химической модификации [27]. Его строение способствует формированию различных типов связи с компонентами слизистой оболочки, что определяет его мукоадгезивные свойства [28]. Хитозан в случае применения на слизистых оболочках способствует раскрытию плотных межклеточных контактов и лучшему всасыванию лекарственного препарата [26]. Хотя наночастицы хитозана могут быть получены различными методами, наиболее широко используемым является ионное гелеобразование: метод прост; при этом, количество содержащихся веществ в активных капсулах может быть максимальным. Эксперименты по изучению хитозановых наночастиц, полученных с помощью этого метода, доказали, что инкапсулированные активные вещества улучшили стабильность и усилили противогрибковую активность в отношении *Botrytis cinerea* [29, 30].

Для капсулирования белков может использоваться метод обратного ионотропного гелеобразования и послойной адсорбции полиэлектролитов, где нерастворимый полиэлектролитный комплекс альгината и хитозана способствует пролонгированному высвобождению белка. Полученные с помощью этого метода наноразмерные частицы оптимальны для применения на слизистых оболочках [26]. В случае обратного ионотропного гелеобразования к раствору полимера и белка добавляются ионы Ca^{2+} . Добавление молекул противоположно заряженного полимера ведёт к образованию обособленных частиц. При послойной адсорбции альгината и хитозана в качестве матрицы для формирования полиэлектролитных частиц используют микросферы из полистирола, меламинформальдегидной смолы или карбоната кальция [26, 31]. Метод послойной адсорбции полиэлектролитов на пористом полидиметилсилоксане комплекс белка с хитозаном позволяет получить монослойную культуру фибробластоподобных клеток с высокой жизнеспособностью [32].

Крахмал — является универсальным возобновляемым полисахаридом и одним из основных источников глюкозы в организме человека. Более того, модификации его физических, химических или биохимических характеристик могут придавать этому биополимеру множество уникальных свойств. Поэтому крахмал и его производные часто используются для инкапсулирования активных веществ [33]. Получены стабильные наночастицы крахмала (300–400 нм) путём его растворения в мочеvine и абсолютном

этаноле, перспективные в качестве эффективной доставки лекарств [34].

1. 2. Биополимеры на основе белка. Белки являются перспективной основой получения наносистем для целевой доставки лекарственных веществ благодаря их структурно-функциональным характеристикам, которые обеспечивают эмульгируемость, растворимость, стабильность и др. [35].

Казеин — это амфифильный белок, который имеет способность к взаимодействию с другими белками или органическими соединениями, формируя мицеллярные комплексы. Благодаря свойству гидрофобных и гидрофильных аминокислотных фрагментов казеина или казиената эти природные биополимеры могут быть использованы в качестве нанокапсулирующих частиц. Установлена способность к самосборке пептидов казеина и омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в наномицеллы с размером 50–60 нм [34]. Также отмечена возможность получения наночастиц с чёткой структурой ядра и оболочки из комплекса сополимера полимолочной кислоты, гликолевой кислоты и казеина [36]. В другом исследовании авторами получены конъюгированные наночастицы размером около 200 нм при использовании мицелл казеина и частиц нанозолота [37]. Количеством глутарового альдегида можно регулировать размер суперпарамагнитных наночастиц казеина с 15 нм до 50 нм. Полученные нетоксичные наночастицы продемонстрировали как высокофункциональные наноносители противоопухолевых препаратов [38].

Зеин — белок растительного происхождения из группы проламинов, содержащийся в зёрнах кукурузы. Он нерастворим, но благодаря своей амфифильной природе обладает свойствами самосборки, поэтому его используют для образования микро- и наночастиц. Зеин также имеет широкое фармацевтическое применение как материала для контролируемого высвобождения лекарств, благодаря хорошей биосовместимости и способности гидратироваться. Его гидрофобная область может быть полимеризована в коллоидные частицы диаметром 50–550 нм [39].

Сывороточные белки, широко используемые при проектировании комплексных систем белок–полисахарид, являются универсальными наноносителями для доставки диагностических и терапевтических препаратов с хорошей биосовместимостью и улучшенной фармакокинетикой. Экспериментально доказано, что денатурированные молекулы лактоферина могут сшивать сывороточные белки посредством дисульфидных связей и гидрофобных взаимодействий. Полученные системы, имеют более высокий уровень упругости и влагоудерживающую способность [40, 41].

1. 3. Комплексообразование биополимеров. Комбинированное применение полимеров с це-

лью получения наночастиц обеспечивает им дополнительные функциональные свойства [42]. В настоящее время основными направлениями получения биополимерных наночастиц является самоассоциация отдельных биополимеров и разделение фаз в их смесях [43]. Наиболее перспективным и широко используемым является метод комплексной коацервации, который реализуется за счёт введения двух видов полиэлектролитов (желатин, гуммиарабик, карбоксиметилцеллюлоза, альгинат, хитозан и полилизин) с противоположными зарядами в состав мембраны, в результате чего происходит диспергирование активного вещества в центре. При реализации данного метода размеры мембран могут быть уменьшены путём изменения температуры, концентрации веществ в растворе или посредством добавления электролита из неорганической соли, что приводит к изменению электростатических взаимодействий в системе. Примером нанокапсул, полученных методом комплексной коацервации, являются капсулы рыбьего жира размером от 26 до 114 нм с использованием гуммиарабика и желатина [44].

Методы нанокапсулирования на основе биополимеров, несомненно, имеют множество преимуществ, однако из-за необходимости применения сложных химико-физических процессов мониторинга, возможности их применения в массовом производстве ограничены.

2. Нанокапсулирование на основе липидов.

Основными преимуществами наносителей на липидной основе является их способность к инкапсуляции, низкая токсичность и биоразлагаемость, которые обеспечиваются за счёт применения природных материалов [45]. Наиболее широкое распространение в промышленности получили наноэмульсии, липосомы и твёрдые липидные наночастицы [46].

2.1. Наноэмульсии. Наноэмульсии представляют собой наноразмерные капли многофазной коллоидной дисперсии, образующиеся путём диспергирования двух несмешивающихся жидкостей [47] с размерами от десятков до сотен нанометров и широко применяются в фармацевтике, пищевой и косметической промышленности благодаря своим преимущественным свойствам, а именно малые размеры, большая площадь поверхности на единицу объёма, улучшенное диспергирование активных гидрофобных компонентов и высокая абсорбция [48]. Однако при работе с эмульсиями необходимо учитывать тот факт, что они являются термодинамически нестабильными системами и быстро разделяются на две дискретные фазы. В связи с чем вопросам их стабилизации уделяется много внимания, и самый перспективным способом в этом отношении считается применение поверхностно-активных молекул —

эмульгаторов [49], в качестве которых наиболее часто используются Span-80, Tween-80, глицерин [50], казеин и соевый лецитин [51], триглицериды [52]. Установлено, что применение в качестве стабилизатора этанола в сочетании с Tween-80, в частности в составе лекарственного препарата — доцетаксела, значительно снижала токсичность, не вызывая уменьшения противоопухолевой активности [48, 53, 54].

Для получения наноэмульсий требуется двухступенчатый процесс, при котором сначала формируются грубые эмульсии, а затем с целью уменьшения частиц до наноразмеров применяются гомогенизация под высоким давлением, ультразвуковая обработка и микрофлюидизация. Указанные методы относятся к высокоэнергетическим технологиям эмульгирования [47, 49]. При исследовании в эксперименте установлено, что использование ультразвука в качестве внешнего источника энергии способствует оптимизации наноэмульгирования и уменьшению размеров частиц до 13 нм в полученной наноэмульсии [55]. С помощью ультразвука успешно получены наноэмульсии гидрофобного действующего вещества в водной системе с размером капель 15 нм с более выраженной фармакологической активностью [56]. В методах низкоэнергетического эмульгирования используются специальные химические, физические, термические условия, индуцирующие образование наноэмульсии, а именно эмульгирование вытеснением растворителем, температурный метод фазовой инверсии, самоэмульгирование и полиморфный фазовый переход [47, 54–57].

Наноэмульсия является одной из самых перспективных лекарственных форм, полученных с применением нанотехнологий в фармацевтических целях. Наимельчайшие капли наноэмульсии имеют неоспоримые преимущества перед другими системами доставки лекарств. Они позволяют улучшить водорастворимость и биодоступность лекарственного препарата. Во многих отечественных и зарубежных публикациях находит подтверждение факт, что наноэмульсии существенно увеличивают скорость проникновения в поражённые клетки различных препаратов, в частности противовирусных и противоопухолевых [58–60]. Наноэмульсии имеют большие перспективы в создании лекарственных препаратов на основе наноэмульгирования, которые позволили бы резко снизить дозировку препарата, обеспечить его адресную доставку, увеличить местную концентрацию препарата и свести к минимуму побочные эффекты.

2.2. Нанолипосомы. Нанолипосомы представляют собой сферические везикулы, состоящие из фосфолипидных бислоев, в которых могут быть инкапсулированы как гидрофильные, так

и липофильные соединения, что определяет универсальность данной системы доставки лекарственных веществ [54, 61–64]. По сравнению с другими системами доставки, нанолипосомы имеют свои преимущества, а именно они гипоаллергенны, более биосовместимы и биоразлагаемы, менее иммуногенны и токсичны [47, 54, 55]. В зависимости от размера частиц и числа образующих липидных слоёв липосомальные системы подразделяются на малые мономеллярные с размером частиц до 50 нм и образованные одиночным липидным бислоем, крупные мономеллярные с размером от 50 до 200 нм и многослойные или мультимеллярные с размером до 1×10^4 нм и насчитывающие до нескольких десятков слоёв [54, 55, 62]. С технологической точки зрения наиболее предпочтительны липосомы с меньшим размером частиц, для которых характерны стабильный поверхностный электрический заряд и более высокая эффективность инкапсуляции [54, 63].

Проницаемость липосомальной мембраны определяет, насколько хорошо препарат удерживается внутри системы. Стабильность мембраны зависит от упаковки углеводородных цепей, входящих в состав её молекул. При исследовании фармакологических свойств липосом с плотно упакованными углеводородными цепями было установлено, что длительная циркуляция в организме способствует их накоплению в тканях опухолей и очагах воспаления.

С целью достижения максимальной эффективности лекарственного средства решающее значение имеет скорость высвобождения его из системы доставки. В связи с чем, с целью замедления разрушения системы и предотвращения преждевременного высвобождения действующего вещества, на её поверхность наносят гидрофильное полимерное покрытие, например: «пегилированные» системы, покрытые полиэтиленгликолевыми конъюгированными липидами [47, 64]. Всё большую популярность приобретает получение липосом, нацеленных на клетки и их органеллы. Одним из известных нацеливающих лигандов на митохондрии является липофильный катион трифенилфосфония. Активное нацеливание системы доставки на конкретные клетки может быть достигнуто путём конъюгирования с липосомальной поверхностью различных лигандов, избирательно взаимодействующих с рецепторами клеток. Наиболее часто используют такие типы лигандов, как антитела, фрагменты антител и витамины [61, 65–69, 70].

В настоящее время разрабатывается нанолипосомальная система с возможностью дистанционного управления [47, 54, 70]. Некоторые исследователи отмечают преимущество липосом с магнитными свойствами (магнитосом), полу-

ченных включением наночастиц магнетита [68, 71]. Большинство известных технологических процессов получения липосом основано на использовании методов гомогенизации, эмульгирования и микроэмульгирования [54, 55]. Способы включения лекарственных соединений в систему доставки зависят от свойств самих соединений и липидов, формирующих липосомы. Для инкапсулирования водорастворимых соединений чаще применяется метод гидратации липидной плёнки. Гидрофобные лекарственные вещества могут включаться в липидную оболочку, а гидрофильные лекарственные средства — во внутреннее водное ядро [47, 72–75].

Таким образом, благодаря наноразмеру, нанолипосомы имеют потенциальное применение в широком спектре областей, включая нанотерапию (например, онкология, инфекционные болезни, генная терапия и др.), косметiku и пищевые технологии. Ещё одним преимуществом нанолипосом является клеточно-специфическое таргетирование, которое является необходимым условием для достижения оптимальной терапевтической эффективности в целевом участке при минимизации неблагоприятного воздействия на здоровые клетки и ткани [64–67].

2.3. Твёрдые липидные наночастицы. Твёрдые липидные наночастицы, также известные как наноструктурированные липидные носители, представляют собой суспензии наноразмерных твёрдых липидных частиц, диспергированных в водной среде. Твёрдые липидные наночастицы в основном получают из жирных кислот (например, пальмитиновая кислота), триглицеридов (например, трилаурин), стероидов (например, холестерин) и глицеридов (например, глицерилмоностеарат) [62]. С технологической точки зрения твёрдые липидные наночастицы очень похожи на эмульсии, но они получены с использованием липида, который при комнатной температуре становится твёрдым с образованием липидной фазы, в результате чего образуются твёрдые дисперсные частицы. Благодаря своей твёрдой структуре, в сравнении с липосомами, они обладают более высокой стабильностью и длительным сроком хранения [76]. Известны два основных способа производства для наноразмерных твёрдых липидных частиц: термическая гомогенизация и гомогенизация с охлаждением [77]. Результаты исследований твёрдых липидных наночастиц, содержащих эфирное масло *Z. multiflora*, глицерил моностеарат, Tween-80, и полоксамер, показали, что новые лекарственные формы проявляют выраженную противогрибковую активность при низких дозах [78]. Установлено, что твёрдые липидные наночастицы, полученные методом гомогенизации под высоким давлением, показали повышенную проницаемость в бактериальные клетки, улучшая

антибактериальную способность действующего вещества [79].

3. Технология инкапсулирования методами электроформования и электрораспыления. Используя технологии электроформования и электрораспыления можно получить такие специфические лекарственные формы, как нановолокна и нановолокнистые каркасы [80]. Электроформование — процесс вытягивания раствора (расплава) полимера в тонкие струи под действием электрического напряжения от единиц до сотни киловольт. Высокое напряжение индуцирует в растворе полимера одноимённые электрические заряды, которые приводят к образованию конусов Тейлора и дальнейшему электростатическому вытягиванию полимерного раствора. В процессе вытягивания полимерная струя может претерпевать ряд последовательных расщеплений на более тонкие струи. Полученные струи в результате испарения растворителя или охлаждения трансформируются в волокна, и под действием электростатических сил дрейфуют к подложке, имеющей противоположное значение электрического потенциала [81, 82]. Данная технология показала своё преимущество при получении нановолокон хитозана, которые в экспериментах на животных показали более выраженную регенераторную активность по сравнению с его традиционной формой [81].

Электрораспыление не имеет принципиальных технологических отличий от электроформования. Однако для медицинского применения этот процесс представляет отдельный интерес, где требуется строгая повторяемость результатов с целью достижения стабильных наноразмерных структур. При жёстком подборе основных параметров процесса возможно добиться получения узко- и монодисперсных аэрозолей в широком диапазоне размеров капель из большого ряда жидкостей и растворов [83].

Использование обеих технологий в фармации является перспективным благодаря следующим преимуществам: изменяемый размер с большой площадью поверхности, способность переносить термочувствительные соединения и возможность массового производства. Технология электроформования успешно используется для получения антимикробных нановолокон для инкапсуляции бактериоцина [84]. Результаты инкапсулирования эфирных масел в биополимер альгината с использованием метода электрораспыления показали сохранение свойств действующего вещества в процессе инкапсулирования и эффективную загрузку [85]. К недостаткам данных методов относится трудоёмкость и необходимость получения нановолокон и нановолокнистых каркасов только с помощью специально разработанного оборудования.

4. Нанокансулирование на основе биодegradуемых минеральных веществ. В настоящее время особым интересом пользуются биодegradуемые наночастицы, получаемые из пористого кремния [86–89]. В исследованиях установлено, что наночастицы пористого кремния способны проникать внутрь клеток, практически не оказывая цитотоксического эффекта при концентрациях вводимой суспензии до 1 мг/мл [88, 90]. Пористая структура наночастицы кремния позволяет загружать и обеспечивает распределённый по времени выход различных пептидов [90], гидрофильных и гидрофобных лекарственных препаратов [91]. Основной проблемой наночастиц более сложного химического состава, является их токсичность и низкая биодegradуемость [92]. В этой связи наночастицы пористого кремния представляются крайне перспективными для биомедицины, например, для применения в различных видах терапии и диагностики, что было подтверждено многочисленными исследованиями [87–91, 93, 94]. Лекарственные препараты, созданные на основе кремниевых наноструктур, обладают основными свойствами, предъявляемыми к системам направленного транспорта лекарственных средств: биосовместимость, лёгкость высвобождения лекарственного средства и возможность различных способов их введения [86]. Наночастицам пористого кремния можно придавать необходимые свойства, путём варьирования технологических параметров, в частности, изменения в широких пределах пористости, покрытия поверхности биополимерами (декстран, ПЭГ и др.), что, в свою очередь, позволяет повышать стабильность, время циркулирования в кровеносной системе, контролировать цитотоксичность и время выхода лекарств под действием внешних воздействий [95, 96]. В настоящее время методы изготовления наночастиц пористого кремния продолжают активно развиваться для упрощения, удешевления и масштабирования процедуры их получения, а также для того, чтобы придать им новые функциональные свойства [93, 94, 96].

Заключение

На протяжении последних десятилетий значительное развитие органической и полимерной химии, физики полимеров, химических технологий в непосредственном взаимодействии с медициной и фармацией содействовало прогрессу в области разработки нанокансулированных систем. Разработка новых более эффективных форм лекарственных препаратов является приоритетным направлением науки не только в России, но и во всём мире. Это объясняется тем, что добиться должной эффективности от традиционных форм некоторых лекарственных средств возможно при увеличении

дозы и частоты их введения. К сожалению, такой подход способствует появлению множества нежелательных побочных эффектов и сказывается на общей эффективности лечения. Для решения указанной проблемы предложены способы нанокапсулирования действующих активных веществ и возможность использования наноразмерных систем, что и рассмотрено в данном исследовании. Обзор научных публикаций позволил сделать вывод, что за последние пять лет создано большое количество новых и усовершенствованных наноразмерных систем доставки лекарственных веществ, обладающих одновременно несколькими функциями, такими как контролируемое высво-

бождение, возможность целенаправленного действия, снижение побочных эффектов и увеличение фармакологической активности.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания (№ 124020300056-9) Министерства здравоохранения Российской Федерации в части проведения НИР по теме «Поиск и разработка высокостабильной липосомальной системы для инкапсулирования соединений с потенциальной антибактериальной активностью на примере хинолоновых производных, активных в отношении *S. aureus*».

Литература/References

1. Sung Y.K., Kim S.W. Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomater Res.* 2020; 24: 12. doi: <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00190-7>.
2. Liao W., Badri W., Dumas E., Ghnimi S., Elaissari A., Saurel R. et al. Nanoencapsulation of essential oils as natural food antimicrobial agents: an overview. *Appl Sci.* 2021; 11: 5778. doi: <https://doi.org/10.3390/app11135778>.
3. Braz A.L., Ahmed I. Manufacturing processes for polymeric micro and nanoparticles and their biomedical applications. *AIMS Bioengineering.* 2017; 4 (1): 46–72. doi: <https://doi.org/10.3934/bioeng.2017.1.46>.
4. Поленов Ю.В., Лукин М.В. Егорова Е.В. Физико-химические основы нанотехнологий: учебное пособие. Иваново: Ивановский государственный химико-технологический университет. 2013; 196. [Polenov Yu.V., Lukin M.V. Egorova E.V. Fiziko-khimicheskie osnovy nanotekhnologii: uchebnoe posobie. Ivanovo: Ivanovskij gosudarstvennyj Khimiko-Tekhnologicheskij Universitet. 2013: 196. (in Russian)]
5. Постнов В.Н., Наумышева Е.Б., Королев Д.В., Галагудза М.М. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов. *Биотехносфера.* 2013; 6 (30): 16–27. [Postnov V.N., Naumysheva E.B., Korolev D.V., Galagudza M.M. Nanorazmernye nositeli dlya dostavki lekarstvennykh preparatov. *Biotekhnosfera.* 2013; 6 (30): 16–27. (in Russian)]
6. Narang A.S., Chang R.-K., Hussain M.A. Pharmaceutical development and regulatory considerations for nanoparticles and nanoparticulate drug delivery systems. *Pharm Sci.* 2013; 102 (11): 3867–3882. doi: <https://doi.org/10.1002/jps.23691>.
7. Prakash A., Baskaran R., Paramasivam N., Vadivel V. Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. *Food Res. Int.* 2018; 111: 509–523. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.066>.
8. McClements D.J. Nanoparticle- and microparticle-based delivery systems. 1st Edition: Boca Raton; 2014. doi: <https://doi.org/10.1201/b17280>.
9. Dalmolin L.F., Khalil N.M., Mainardes R.M. Delivery of vanillin by poly (lactic-acid) nanoparticles: Development, characterization and in vitro evaluation of antioxidant activity. *Mater. Sci. Eng. C.* 2016; 62: 1–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.031>.
10. Pérez-Masiá R., López-Nicolás R., Perigo M.J., Ros G., Lagaron J.M., López-Rubio A. Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. *Food Chem.* 2015; 168: 124–133. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.051>.
11. Bejraha P., Min, S.-G., Surassmo S., Choi M.-J. Physicochemical properties of freeze-dried fish oil nanocapsules frozen under different conditions. *Dry Technol.* 2010; 28: 481–489. doi: <https://doi.org/10.1080/07373931003613684>.
12. Chew S.-C., Nyam K.-L. Microencapsulation of kenaf seed oil by co-extrusion technology. *J Food Eng.* 2016; 175: 43–50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.002>.
13. Penalva R., Esparza I., Agüeros M., Gonzalez-Navarro C.J., Gonzalez-Ferrero C., Irache J.M. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocoll.* 2015; 44: 399–406. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.004>.
14. Arroyo-Maya I.J., McClements D.J. Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties. *Food Res. Int.* 2015; 69: 1–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.005>.
15. Blanco-Padilla A., Soto K.M., Hernández Iturriaga M., Mendoza S. Food antimicrobials nanocarriers. *ScientificWorldJournal.* 2014; 2014: 837215. doi: [10.1155/2014/837215](https://doi.org/10.1155/2014/837215).
16. Shishir M.R.L., Xie L., Sun C., Zheng X., Chen W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends Food Sci Technol.* 2018; 78: 34–60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>.
17. Jia Z., Dumont M.-J., Orsat V. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Biosci.* 2016; 15: 87–104.
18. Saberi A.H., Fang Y., McClements D.J. Influence of surfactant type and thermal cycling on formation and stability of flavor oil emulsions fabricated by spontaneous emulsification. *Food Res. Int.* 2016; 89: 296–301. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.007>.
19. Dasgupta N., Ranjan S., Munda S., Ramalingam C., Kumar A. Fabrication of food grade vitamin E nanoemulsion by low energy approach, characterization and its application. *Int. J. Food Prop.* 2016; 19: 700–708. doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1042587>.
20. Asbahani A. El., Miladi K., Badri W., Sala M., Addi E.A., Casabianca H. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharm.* 2015; 483: 220–243. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>.
21. Бочков П.О., Кольванов Г.Б., Литвин А.А., Жердев В.П., Шевченко Р.В. Влияние высокомолекулярных вспомогательных веществ на оптимизацию фармакокинетических свойств лекарственных препаратов. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2016. №1. С. 3–11. [Bochkov P.O., Kolyvanov G.B., Litvin A.A., Zherdev V.P., Shevchenko R.V. Vliyanie vysokomolekulyarnykh vspomogatel'nykh veshchestv na optimizatsiyu farmakokineticheskikh svoystv lekarstvennykh preparatov. *Farmakokinetika i farmakodinamika* 2016; (1): 3–11 (In Russ.)]
22. Lee M.-Y., Min, S.-G., You S.-K., Choi M.-J., Hong G.-P., Chun J.-Y. Effect of β-cyclodextrin on physical properties of nanocapsules manufactured by emulsion-diffusion method. *J. Food Eng.* 2013; 119: 588–594. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.018>.
23. Kurkov S.V., Madden D.E., Carr D., Lofsson T. The effect of parenterally administered cyclodextrins on the pharmacokinetics of coadministered drugs. *J. Pharm. Sci.* 2012; 101: 12: 4402–4408. doi: <https://doi.org/10.1002/jps.23329>.
24. Tserennadmid R., Takó M., Galgóczy L., Papp T., Pesti M., Vágöölgyi C., et al. Anti-yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int. J. Food Microbiol.* 2011; 144: 480–486. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.004>.
25. Киржанова Е.А. Печенкин М.А., Демина Н.Б., Балабушевич Н.Г. Микро- и наночастицы из альгината и хитозана для трансмукозальной доставки бека // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2016; 57 (2): 103–111. doi: <https://doi.org/10.3103/s002713141602005x>. [Kirzhanova E.A. Pechenkin M.A., Demina N.B., Balabushevich N.G. Alginate-chitosan micro- and nanoparticles for transmucosal delivery of proteins. *Moscow University Chemistry Bulletin.* 2016; 57 (2): 103–111. doi: <https://doi.org/10.3103/s002713141602005x>. (in Russian)]
26. Rezagholizade-shirvan A., Masrournia M., Fathi Najafi M., Behmadi H. Synthesis and characterization of nanoparticles based on chitosan-biopolymers systems as nanocarrier agents for curcumin: study on pharmaceutical and environmental applications. *Polym. Bull.* 2023; 80: 1495–1517. doi: <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04095-4>.
27. Sosnik B.A. Alginate particulate gels for oral drug delivery. In: Azevedo H.S., Mano J.F., Borges J., editors. *Soft Matter for Biomedical Applications: Ebook collection*; 2021. doi: <https://doi.org/10.1039/9781839161124-00155>.
28. Mohammadi A., Hashemi M., Hosseini S.M. Nanoencapsulation of Zataria multiflora essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2015; 28: 73–80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.12.011>

29. Ghaderi-Ghahfarokhi M., Barzegar M., Sahari M.A., Azizi M.H. Nanoencapsulation approach to improve antimicrobial and antioxidant activity of thyme essential oil in beef burgers during refrigerated storage. Food Bioprocess Technol. 2016; 9: 1187–1201. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1708-z>
30. Cerqueira M.A., Pinheiro A.C., Ramos O.L., Silva H., Bourbon A.I. Vicente A.A. Chapter two — advances in food nanotechnology. In: Emerging Nanotechnologies in Food Science: Micro and Nano Technologies; 2017, p. 11–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42980-1.00002-9>.
31. Куликовская В.И., Парибок И.В., Пинчук С.В., Красковский А.Н., Василевич И.Б., Матиевский К.А. и др. Плёнки полидиметилсилоксана, модифицированные мультислойми хитозан/пектин, – носители мезенхимальных стволовых клеток. Прикладная биохимия и микробиология. 2018; 54 (5): 465–471. doi: <https://doi.org/10.1134/S0555109918050100>. [Kulikovskaya V.I., Paribok I.V., Pinchuk S.V., Krasovskii A.N., Vasilevich I.B., Matievskii K.A. i dr. Plenki polidimetilsiloksana, modifitsirovannye mul'tisloyami khitozan/pektin, – nositeli mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya. 2018; 54 (5): 465–471. doi: <https://doi.org/10.1134/S0555109918050100>. (in Russian)]
32. Fathi M., Donsi F., McClements D.J. Protein-based delivery systems for the nanoencapsulation of food ingredients. Food Science. 2018; 17 (4): 920–936. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12360>.
33. Pang S.C., Chin S.E., Nadirah A., Tay S.H., Yazid S.N.A.M. Fabrication of polysaccharide-based nanoparticles as drug delivery nanocarriers. M02-Nano-Micro Sensors and Systems in Healthcare and Environmental Monitoring. Meet. Abstracts: 2015; MA2015-01: 2100. doi: <https://doi.org/10.1149/MA2015-01/40/2100>.
34. Zhang Y., Chen H., Pan K. Chapter 5-Nanoencapsulation of food antimicrobial agents and essential oils. In: Nanoencapsulation of food bioactive ingredients. S.M.Jafari (ed.). Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; 183–221. doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809740-3.00005-2>.
35. Narayanan S., Pavithran M., Viswanath A., Narayanan D., Mohan C.C., Manzoor K., Menon D. Sequentially releasing dual-drug-loaded PLGA-casein core/shell nanomedicine: Design, synthesis, biocompatibility and pharmacokinetics. Acta Biomater. 2014; 10: 2112–2124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.041>
36. Dai Y., Ren T., Wang Y., Zhang X. Polyion complex micelles to stabilize gold nanoparticles for catalytic reduction of 4-nitrophenol. Gold Bulletin. 2018; 51: 21–26. doi: <https://doi.org/10.1007/s13404-017-0225-9>.
37. Singh A., Bajpai J., Bajpai A.K. Investigation of magnetically controlled water intake behavior of iron oxide impregnated superparamagnetic casein nanoparticles (IOICNPs). Nanobiotechnology. 2014; 38: 1–12. doi: <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0038-4>.
38. Kim S., Peterson S.C. Optimal conditions for the encapsulation of menthol into zein nanoparticles. LWT. 2021; 144: 111213. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111213>.
39. Li Q., Zhao Z. Interaction between lactoferrin and whey proteins and its influence on the heat-induced gelation of whey proteins. Food Chem. 2018; 252: 92–98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.114>.
40. Ghasemi S., Jafari S.M., Assadpour E., Khomeiri M. Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. Carbohydr Polym. 2017; 177, 369–377. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.009>.
41. Hosseini S.M.H., Emam-Djomeh Z., Sabatino F., Van der Meer P. Nano-complexes arising from protein-polysaccharide electrostatic interaction as a promising carrier for nutraceutical compounds. Food Hydrocoll. 2015; 50: 16–26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.006>.
42. Elahi N., Rizwan M. Progress and prospects of magnetic iron oxide nanoparticles in biomedical applications: a review. Artif Organs. 2021; 45 (11): 1272–1299. doi: <https://doi.org/10.1111/aor.14027>.
43. Esfahani R., Jafari S.M., Jafarpour A., Dehmad D. Loading of fish oil into nanocarriers prepared through gelatin-gum Arabic complexation. Food Hydrocoll. 2019; 90: 291–298. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.044>.
44. Fathi M., Mozafari M.-R., Mohebbi M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid-based delivery systems. Trends Food Sci. Technol. 2012; 23: 13–27. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>.
45. Azmi N.A.N., Elgharbaui A.A.M., Motlagh S.R., Samsudin N., Salleh H.M. Nanoemulsions: factory for food, pharmaceutical and cosmetics. Processes. 2019; 7 (9): 617. doi: <https://doi.org/10.3390/pr7090617>.
46. Попова Е.В., Бельтюков П.П., Радиллов А.С. Современные тенденции в разработке и производстве наноразмерных систем для доставки лекарственных соединений. Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2020; 20 (2): 206–222. doi: <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2020-20-2-206-222>. [Popova E.V., Bel'tyukov P.P., Radilov A.S. Sovremennye tendentsii v razrabotke i proizvodstve nanorazmernykh sistem dlya dostavki lekarstvennykh soedinenii. Nauchno-Tekhnicheskii Vestnik Informatsionnykh Tekhnologii, Mekhaniki i Optiki. 2020; 20 (2): 206–222. doi: <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2020-20-2-206-222>. (in Russian)]
47. Koroleva M.Y., Nagovitsina T.N., Yurtov E.V. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms. Phys Chem Chem Phys. 2018; 20: 10369–10377. doi: <https://doi.org/10.1039/C7CP07626F>.
48. Алексеев К.В., Кедик С.А. Фармацевтическая технология: учебник. М.: АО ИФТ; 2019; 570. [Alekseev K.V., Kedik S.A. Farmatsevticheskaya Tekhnologiya: Uchebnik. M.: AO IFT. 2019; 570. (in Russian)]
49. Nirmal N.P., Mereddy R., Li L., Sultanbawa Y. Formulation, characterisation and antibacterial activity of lemon myrtle and anise myrtle essential oil in water nanoemulsion. Food Chem. 2018; 254: 1–7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.173>.
50. Silva H.D., Cerqueira M.A., Vicente A.A. Nanoemulsions for food applications: Development and characterization. Food Bioprocess Technol. 2012; 5: 854–867. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7>.
51. Chang Y., McLandsborough L., McClements D.J. Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). Food Chemistry. 2015; 72: 298–304. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.081>.
52. Алексеев К.В., Кедик С.А., Блынская Е.В. Фармацевтическая нанотехнология: учебное пособие. 2-е изд. М.: АО ИФТ; 2016; 544. [Alekseev K.V., Kedik S.A., Blynskaya E.V. Farmatsevticheskaya nanotekhnologiya: uchebnoe posobie. 2-e izdanie. Moscow: AO IFT. 2016; 544. (in Russian)]
53. Yukuyama M.N., Ghisleni D.D.M., Pinto T.J.A., Bou-Chacra N.A. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics — a review. Int J Cosmet Sci. 2016; 38 (1): 13–24. doi: <https://doi.org/10.1111/ics.12260>.
54. Afzal S.M., Shareef M.Z., Kishan V. Transferrin tagged lipid nanoemulsion of docetaxel for enhanced tumor targeting. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2016; 36: 175–182. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.10.008>.
55. Hashtjin A.M., Abbasi S. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. Food Hydrocoll. 2015; 44: 40–48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.017>.
56. Khan W., Hussain Z., Siddique N.F. Nanoemulsion: a way to enhance bioavailability. World Journal of Pharmaceutical Research. 2018; 7 (2): 522–531. doi: <https://doi.org/10.10959/wjpr20182-10807>.
57. Hörmann K., Zimmer A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions — a review. J Control Release. 2016; 223: 85–98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.016>.
58. Patel N.R., Piroyan A., Ganta S., Morse A.B., Candiloro K.M., Solon A.L. et al. In vitro and in vivo evaluation of a novel folate-targeted theranostic nanoemulsion of docetaxel for imaging and improved anticancer activity against ovarian cancers. Cancer Biol Ther. 2018; 19 (7): 554–564. doi: <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1395118>.
59. Fofaria N.M., Quattal H.S.S., Liu X., Srivastava S.K. Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine — Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. Internat J Pharm. 2016; 498 (1–2): 12–22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.045>.
60. Urquhart A.J., Eriksen A.Z. Recent developments in liposomal drug delivery systems for the treatment of retinal diseases. Drug Discov Today. 2019; 24 (8): 1660–1668. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.04.004>.
61. Zhang L., Pornpattananangkul D., Hu C.-M., Huang C.-M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. Curr Med Chem. 2010; 17: 585–594. doi: <https://doi.org/10.2174/092986710790416290>.
62. Zylberberg C., Matosevic S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. Drug Deliv. 2016; 23 (9): 3319–3329. doi: <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>.
63. Milani D., Athiyah U., Hariyadi D.M., Pathak Y.V. Surface Modifications of Liposomes for Drug Targeting. Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. Springer. 2019: 207220. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-06115-9_11.
64. Amiri S., Ghanbarzadeh B., Hamishehkar H., Hosein M., Babazadeh A., Adun P. Vitamin E loaded nanoliposomes: effects of gamma-oryzanol, polyethylene glycol and lauric acid on physicochemical properties. Colloid and Interface Science Communications. 2018; 26: 1–6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2018.07.003>.
65. Furuhashi H., Tomita K., Teratani T., Shimizu M., Nishikawa M., Higashiyama M. et al. Vitamin A-coupled liposome system targeting free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells offers a beneficial therapeutic strategy for liver fibrosis. Hepatol Res. 2018; 48 (5): 397–407. doi: <https://doi.org/10.1111/hepr.13040>.
66. Madni A., Sarfraz M., Rehman M., Ahmad M., Akhtar N., Ahmad S. et al. Liposomal drug delivery: A versatile platform for challenging clinical applications. J Pharm Pharm Sci. 2014; 17 (3): 401–426. doi: <https://doi.org/10.18433/J3CP55>.

67. Gabizon A., Shmeeda H., Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: Review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42 (5): 419–436. doi: 10.2165/00003088-200342050-00002.
68. Grüll H., Langereis S. Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound. *J Control Release.* 2012; 161 (2): 317–327. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.041.
69. Salkho N.M., Awad N.S., Pitt W.G., Husseini G.A. Photo-induced drug release from polymeric micelles and liposomes: Phototriggering mechanisms in drug delivery systems. *Polymers (Basel).* 2022; 14 (7): 1286. doi: 10.3390/polym14071286.
70. Askari A., Tajvar S., Nikkhah M., Mohammadi S., Hosseinkhani S. Synthesis, characterization and *in vitro* toxicity evaluation of doxorubicin-loaded magnetoliposomes on MCF-7 breast cancer cell line. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2020; 55: 101447. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101447>.
71. Mehrarya M., Gharehchelou B., Kabarkouhi Z., Ataei S., Esfahani F.N., Wintrasiri M.N. et al. Functionalized nanostructured bioactive carriers: nanoliposomes, quantum dots, tocosome, and theranostic approach. *Curr Drug Deliv.* 2022; 20 (12): 1001–1011. doi: 10.2174/1567201819666220324092933.
72. Neyestani M., Shariatifar N. Food ingredient encapsulation using nanoliposome technology: a review study. *Journal of Food Safety and Hygiene.* 2021. doi: <https://doi.org/10.18502/jfsh.v5i4.5697>.
73. Donsi E., Annunziata M., Sessa M., Ferrari G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT Food Sci. Technol.* 2011; 44: 1908–1914. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.003>.
74. Bai C., Peng H., Xiong H., Liu Y., Zhao L., Xiao X. Carboxymethylchitosan-coated proliposomes containing coix seed oil: characterisation, stability and *in vitro* release evaluation. *Food Chem.* 2011; 129: 1695–1702. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.033>.
75. Guan P., Lu Y., Qi J., Niu M., Lian R., Wu W. Solidification of liposomes by freeze-drying: The importance of incorporating gelatin as inferior support on enhanced physical stability. *Int J Pharm.* 2015; 478: 655–664. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.016.
76. Neumann K., Lilienkampff A., Bradley M. Responsive polymeric nanoparticles for controlled drug delivery. *Polymer International* 2017; 66 (12): 1756–1764. doi: <https://doi.org/10.1002/pi.5471>.
77. Nasserli M., Arouiee H., Golmohammadzadeh S., Jaafari M.R., Neamati H. Antifungal Effects of Zataria multiflora Essential Oil on the Inhibitory Growth of some Postharvest Pathogenic Fungi. *Notulae Scientia Biologicae.* 2015; 7 (4): 12–13. doi: <https://doi.org/10.15835/nsb749650>.
78. Jourghanian P., Ghaffari S., Ardjmand M., Haghighat S., Mohammadnejad M. Sustained release curcumin loaded solid lipid nanoparticles. *Adv Pharm Bull.* 2016; 6: 17. doi: 10.15171/apb.2016.04.
79. Прищепенко Д.В., Прокопчук Н.Р., Шашок Ж.С. Влияние технологических параметров электроформования на морфологию и плотность нанесения нановолокон хитозана. *Труды БГТУ.* 2016; 4: 114–120. [Prishchepenko D.V., Prokopchuk N.R., Shashok Zh.S. Vliyaniye tekhnologicheskikh parametrov elektroformovaniya na morfologiyu i plotnost' naneseniya nanovolokon khitozana. *Trudy BGTU.* 2016; 4: 114–120. (in Russian)]
80. Cheng Z.-L., Qin X.-X., Liu Z., Qin D.-Z. Electrospinning preparation and mechanical properties of PVA/HNTs composite nanofibers. *Polym Adv.* 2016; 28 (6): 768–774. doi: <https://doi.org/10.1002/pat.3975>.
81. Хоменко А.Ю. Регулирование морфологии и свойств нетканых и высокодисперсных биосовместимых материалов на основе хитозана и полимеров молочной кислоты, полученных методом электроформования. Дис. ... канд. ф.-мат. наук М.: 2016. Доступно по: <http://nrcki.ru/files/pdf/1461589130.pdf?ysclid=lvdod5qhjn989054638>. Ссылка активна на 12.12.2023. [Khomenko A.Yu. Regulirovaniye morfologii i svoystv netkanykh i vysokodispersnykh biosovmestimykh materialov na osnove khitozana i polimerov molochnoi kisloty, poluchennykh metodom elektroformovaniya. [dissertation] Moscow: 2016. Dostupno po: <http://nrcki.ru/files/pdf/1461589130.pdf?ysclid=lvdod5qhjn989054638>. Ssylka aktivna na 12.12.2023. (in Russian)]
82. Heunis T.D.J., Botes M., Dicks L.M.T. Encapsulation of Lactobacillus plantarum 423 and its Bacteriocin in Nanofibers. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2010; 2: 46–51. doi: 10.1007/s12602-009-9024-9.
83. Ghayempour S., Mortazavi S. Antibacterial activity of peppermint fragrance micro-nanocapsules prepared with a new electro-spraying method. *J Essent Oil Res.* 2014; 26: 492–498. <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.949882>
84. Zinovyev S.V., Saprikina N.S., Kargina J.V., Le-Deygen I.M., Sviridov A.P., Bazylenko T.Yu. et al. *In-vivo* studies of ultrasound-activated drug-loaded porous silicon nanoparticles for cancer therapy application. *KnE Energy.* 2018; 3 (2): 556–562. doi: <https://doi.org/10.18502/ken.v3i2.1865>.
85. Osminkina L.A., Tamarov K.P., Sviridov A.P., Galkin R.A., Gongalsky M.B., Solovyev V.V. et al. Photoluminescent biocompatible silicon nanoparticles for cancer theranostic application. *J Biophotonics.* 2012; 5 (7): 529–535. doi: 10.1002/jbio.201100112.
86. Tamarov K.P., Osminkina L.A., Zinovyev S.V., Maximova K.A., Kargina J.V., Gongalsky M.B. et al. Radio frequency radiation-induced hyperthermia using Si nanoparticle-based sensitizers for mild cancer therapy. *Sci Rep.* 2014; 4: 7034. doi: 10.1038/srep07034.
87. Santos H.A., Riikonen J., Salonen J., Makila E., Heikkila T., Laaksonen T., *In vitro* cytotoxicity of porous silicon microparticles: Effect of the particle concentration, surface chemistry and size. *Acta Biomater.* 2010; 6: 2721. doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.043.
88. Kälpeläinen M., Monkare J., Riikonen J., Vlasova M., Salonen J., Lehto V.P. et al. Mesoporous silicon microparticles as carriers for peptides. *J Control Release.* 2010; 148 (1): e43–e44. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.07.050.
89. Xu W., Riikonen J., Lehto V.P. Mesoporous systems for poorly soluble drugs. *Int J Pharm.* 2013; 453 (1): 181–197. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.008.
90. Yildirimer L., Thanh N.T.K., Loizidou M., Seifalian A.M. Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano Today* 2011; 6 (6): 585–607. doi: 10.1016/j.nantod.2011.10.001.
91. Polkovnikova Yu.A., Lenshin A.S., Seredin P.V., Minakov D.A. Porous silicon nanoparticles containing neurotropic drugs. *Inorganic Materials.* 2017; 53: 477–483. doi: <https://doi.org/10.1134/s0020168517050156>.
92. Sviridov A.P., Osminkina L.A., Kharin A.Yu., Gongalsky M.B., Kargina J.V., Kudryavtsev A.A. et al. Cytotoxicity control of silicon nanoparticles by biopolymer coating and ultrasound irradiation for cancer theranostic applications. *Nanotechnology.* 2017; 28 (10): 105102. doi: 10.1088/1361-6528/aa5b7c.
93. Konoplyannikov M.A., Eremina A.S., Kargina Yu.V., Le-Deygen I.M., Kharin A.Yu., Bazylenko T.Yu. et al. Mesoporous silicon nanoparticles loaded with salinomycin for cancer therapy applications. *Microporous and Mesoporous Materials.* 2021; 328, 111473. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2021.111473>.
94. Патент РФ на изобретение № 2722745/ 03.06. 2020. Тимошенко В.Ю., Коноплянников М.А., Ле-Дейген И.М., Фесенко И.К., Базыленко Т.Ю., Каргина Ю.В. и др. Способ получения наноконтейнеров для химиотерапевтических противоопухолевых препаратов. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/RU-2722745-C1>. [Patent RUS № 2722745/03.06. 2020. Timoshenko V.Yu., Konoplyannikov M.A., Le-Deigen I.M., Fesenko I.K., Bazylenko T.Yu., Kargina Yu.V. i dr. Sposob polucheniya nanokonteinerov dlya khimioterapevticheskikh protivopukholevykh preparatov. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/RU-2722745-C1>. (in Russian)]
95. Zhang D.-X., Esser L., Vasani R.B., Thissen H., Voelcker N.H. Porous silicon nanomaterials: recent advances in surface engineering for controlled drug-delivery applications. *Nanomedicine.* 2019; 14 (24): 32135(7)3230. doi: 10.2217/nnm-2019-0167.
96. Eremina A.S., Kargina Y.V., Kharin A.Y., Petukhov D.I., Timoshenko V.Yu. Mesoporous silicon nanoparticles covered with PEG molecules by mechanical grinding in aqueous suspensions. *Microporous and Mesoporous Materials.* 2022; 331: 111641. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2021.111641>.

Поступила / Received 24.03.2024
Принята в печать / Accepted 10.04.2024

Информация об авторах

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

Ясенявская Анна Леонидовна — к. м. н., доцент, руководитель Научно-исследовательского центра; доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864

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

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

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 ID: 0000-0001-5417-4477

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

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

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

Молекулярно-генетические механизмы репликации вируса гриппа А и механизмы действия этиотропных препаратов

М. Н. ДУНАЕВА

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

ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, Россия

Резюме

Грипп — острая респираторная вирусная инфекция, известная своими эпидемиями и пандемиями, уносит миллионы жизней повсеместно. Вирус гриппа А (Influenza A virus, сем. *Orthomyxoviridae*), геном которого представляет из себя 8 РНК сегментов отрицательной полярности, широко распространён в связи со своими паттернами изменчивости, обуславливающими развитие устойчивости, например, к противовирусным лекарственным препаратам. Механизмы реассортации и точечные мутации генома вируса гриппа А способны приводить к великому множеству разнообразных вариантов данного патогена. Рассматриваемый жизненный цикл вируса гриппа А с подробным описанием молекулярно-генетических особенностей строения его структур позволяет подчеркнуть преимущества и недостатки используемой этиотропной терапии, воздействующей на разные стадии репликации вируса с точки зрения доказательной медицины в аспектах, связанных с его резистентностью.

Ключевые слова: острые-респираторные вирусные инфекции; ОРВИ; грипп; молекулярная генетика; мутации; резистентность; противовирусные препараты; рациональная терапия

Для цитирования: Дунаева М. Н. Молекулярно-генетические механизмы репликации вируса гриппа А и механизмы действия этиотропных препаратов. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (3–4): 73–94. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-73-94>. EDN: XVHPXT.

Molecular Genetic Mechanisms of Influenza A Virus Replication and Mechanisms of Action of Etiotropic Medications

MARIYA N. DUNAeva

Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G. P. Somov of Rosпотребнадзор, Vladivostok, Russia
Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abstract

Influenza is an acute respiratory viral infection, known for its epidemics and pandemics, claiming millions of lives everywhere. Influenza A virus (*Orthomyxoviridae* family), whose genome consists of 8 RNA segments of negative polarity, is widespread due to its patterns of variability, which determine the development of resistance, for example, to antiviral drugs. Reassortment mechanisms and point mutations in the influenza A virus genome can lead to a great variety of different variants of this pathogen. The considered life cycle of the influenza A virus with a detailed description of the molecular genetic features of its structures allows us to highlight the advantages and disadvantages of the etiotropic therapy used, affecting different stages of virus replication from the point of view of evidence-based medicine in aspects related to its resistance.

Keywords: acute respiratory viral infections; ARVI; influenza; molecular genetics; mutations; resistance; antiviral drugs; rational therapy

For citation: Dunaeva M. N. Molecular genetic mechanisms of influenza A virus replication and mechanisms of action of etiotropic medications. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (3–4): 73–94. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-73-94>. EDN: XVHPXT.

Введение

Каждый год в период осеннее-зимнего и зимне-весеннего периода межсезонья существует высокая степень вероятности заражения острыми респираторными заболеваниями. Одним из

таких возбудителей ОРЗ, способных привести к серьёзным последствиям (осложнениям) и даже летальному исходу, является вирус гриппа [1–3].

Вирус гриппа в международной классификации подразделяется на вирус гриппа А, вирус

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: mariadunaeva29@yandex.ru



*Correspondence to:
E-mail: mariadunaeva29@yandex.ru



гриппа В и вирус гриппа С, а также вирус гриппа D (грипп С и D вызывают болезни животных) [4]. В истории эпидемий вирус гриппа А занимает особое положение среди других инфекций и составляет порядка 90% от всех случаев заболеваемости другими ОРВИ [1–3, 5, 6].

Социальное и экономическое значение данного вируса давно перешло в разряд особо значимых по причине затрат на его лечение и профилактику: ежегодные затраты организациями здравоохранения в развитых странах в пересчёте составляют порядка 420 млрд рублей и в среднем 21 млн рублей затрат персонально пациентами на лечение и восстановление потерь трудоспособности, при этом уровень заболеваемости тяжёлыми формами гриппа, по оценкам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), составляет 5 млн человек [1, 2, 7], а смертность составляет 65 тыс. человек ежегодно. Наиболее обсуждаемые глобальные пандемии гриппа унесли жизни десятков миллионов людей: «испанка» 1918–1919 гг. явилась причиной смерти порядка 50 млн человек по всему земному шару [2, 5, 6], пандемия «свиного» гриппа 2009–2010 гг. унесла жизни 500 тыс. человек по приблизительным подсчётам только в России [1], при этом уровень смертности во время указанных пандемий был самым высоким среди населения в возрасте от 25 до 49 лет [1–3, 8, 9].

В целях раннего выявления новых штаммов вируса гриппа и вызванных ими эпидемий или пандемий организована всемирная служба эпиднадзора. На основании этих данных ВОЗ ежегодно рекомендует органам здравоохранения разных стран наиболее эффективные средства профилактики [1–3].

Вирус гриппа А был выделен у многих животных (свиней, лошадей, диких животных), но основным резервуаром для формирования новых эпидемически значимых вариантов этого вируса являются дикие водоплавающие птицы. Спорадические случаи, вспышки и даже эпидемии вируса гриппа А среди птиц и животных сельскохозяйственного значения, начало которых обусловлено циркуляцией вируса в природных очагах, приводят к масштабным экономическим потерям [1, 2, 5, 6, 10–13].

Грипп — высоко-контагиозное заболевание, передающееся разными путями: воздушно-капельным путём при вдыхании, фекально-оральным путём через проглатывание или через объекты окружающей среды (у животных), способен передаваться от одного вида животного к другому (например, от птиц к млекопитающим) или к человеку.

Вирусы гриппа относятся к семейству Orthomyxoviridae (от *лат.* *myxos* — слизь), получив своё название по причине сродства к мушкетёрам поражае-

мых тканей [3, 5, 6, 14]. Входными воротами для вируса являются клетки эпителия респираторного тракта у человека, животных и птиц, а также клетки эпителия желудочно-кишечного тракта у птиц, на поверхности которых расположены гликопротеины — рецепторы прикрепления вирионов гриппа [5, 6, 15, 16].

Вирион гриппа представляет собой частицу овальной или шарообразной формы, сформированной комплексом белков, являющимся оболочкой для генетического материала — РНК, и белков на поверхности вириона для присоединения к клеткам-мишеням, что подробнее будет рассмотрено далее в тексте. Наиболее патогенетически значимыми являются белки поверхности вирусной частицы гриппа — гемагглютинин (H) и нейраминидаза (N) [1, 2]. Гемагглютинин несёт функцию прикрепления к клетке с последующим процессом проникновения и заражения, а нейраминидаза отвечает за отщепление дочерних вирусных частиц после цикла воспроизведения в заражённой клетке и обеспечивает проникновение вирионов в другие незаражённые клетки.

В настоящий момент известно 18 типов гемагглютининов вируса гриппа А и 11 типов нейраминидаз, большинство из которых найдены у водоплавающих птиц, последние открытые типы вируса гриппа А с 17-м и 18-м гемагглютинином и 10-й и 11-й нейраминидазой обнаружены у летучих мышей [17]. Гемагглютинин и нейраминидаза являются белками, определяющими номенклатуру штаммов вирусов, как например H1N1 или H5N1, где номер гемагглютинина или нейраминидазы обозначают определённую антигенную детерминанту и специфичны при выработке антител в процессе формирования иммунитета [4, 18, 19].

Высокая мутационная изменчивость путём механизмов реассортации при смешанном заражении, когда вирусы гриппа А могут обмениваться сегментами генома вирусов гриппа, приводя к генетической реассортации (*antigenic shift*), точечные мутации (*antigenic drift*), дефект-интерферирующие частицы и РНК-рекомбинации приводят к великому разнообразию молекулярных преобразований во всех 8 сегментах РНК вируса гриппа А [5, 6, 13]. Молекулярный механизм реассортации способен привести к внезапному появлению нового пандемически значимого варианта вируса гриппа А [1–3]. Помимо упомянутых механизмов, РНК-содержащие вирусы в своём репликативном аппарате не имеют механизмов репарации и исправления ошибок в генетической последовательности, что ведёт к накоплению мутаций и постоянному появлению отличий в геноме у вирусного потомства [20–22]. Указанные процессы являются препятствием на пути формирования постоянного естественного иммунитета, а учитывая быстроту развития инфекцион-

ного процесса (высокопатогенный грипп способен привести к смерти за 24–48 ч) в организме, необходимо понимать, каким именно образом данный патоген действует в организме на молекулярном уровне.

Изменения в структуре генома вирусной частицы приводят к вариативности аминокислотного состава в структуре белков вириона, высокой вирулентности и адаптационной способности к клеточным рецепторам нового хозяина, а также выработке резистентности к противовирусным препаратам [1–3, 14, 21–28].

В связи с этим понимание взаимосвязи строения данного вируса, его генетических изменений и жизненного цикла является ключевыми факторами для поиска новых действенных препаратов и оценки эффективности уже существующих и активно применяемых на практике. Данная работа посвящена анализу строения и жизненного цикла вируса гриппа А с точки зрения действия этиотропных препаратов.

Строение вируса гриппа А

Вирус гриппа А (*Influenza A Virus*) относится к семейству Orthomyxoviridae, является оболочечным вирусом. Обычно вирионы имеют округлую, реже удлинённую, форму (рис. 1). Диаметр вирионов 80–120 нм. Геном вируса сегментированный, он состоит из 8 сегментов РНК отрицательной полярности, кодирующих 12–14 белков, количество белков зависит от штамма. Размер сегментов от 890 до 2340 нуклеотидов. Общий размер генома 13,5 Kb [5, 6, 14].

Вирус гриппа А относится к РНК-содержащим вирусам, что является причиной его высокой мутационной изменчивости, равно как и резистентности к лекарственным препаратам: даже одна нуклеотидная замена или промежуток в последовательности основных вирулентных антигенных детерминант вируса гриппа, таких как гемагглютинин и нейраминидаза, приводит к полному из-

менению его инфекционных свойств со слабо вирулентного к смертельно опасному [5, 6, 14, 20–27].

Вирус гриппа А отличается от других типов вируса гриппа В, С и D главными структурными белками — нуклеопротеином (NP) и матричным белком (M1). Механизм реассортации между штаммами вируса гриппа В был продемонстрирован в лабораторных условиях, но вероятно он не является источником высокой мутационной изменчивости в силу его обнаружения только в человеческой популяции. Вирусы гриппа С и D обнаружены у животных [10–13].

Согласно данным GenBank, каждый сегмент генома вируса гриппа А кодирует определённые белки, последовательность которых всегда транскрибируется следующим образом:

- 1) полимеразный белок 2 (PB2) кодируется 1-м сегментом генома (длиной примерно 2277 нуклеотидов или соответственно 759 аминокислот);
- 2) полимеразный белок 1 (PB1) кодируется 2-м сегментом генома (длиной примерно 2270 нуклеотидов или соответственно 757 аминокислот);
- 3) полимераза (PA) кодируется 3-м сегментом генома (длиной примерно 2148 нуклеотидов или соответственно 716 аминокислот);
- 4) гемагглютинин (HA) кодируется 4-м сегментом генома (длиной примерно 1710 нуклеотидов или соответственно 570 аминокислот);
- 5) нуклеопротеин (NP) кодируется 5-м сегментом генома (длиной примерно 1494 нуклеотидов или соответственно 498 аминокислот);
- 6) нейраминидаза (NA) кодируется 6-м сегментом генома (длиной примерно 1410 нуклеотидов или соответственно 470 аминокислот);
- 7) белки М (M1 и M2) кодируются 7-м сегментом генома (длиной примерно 756 и 291 нуклеотид или соответственно 252 аминокислоты и 97 аминокислот);
- 8) неструктурные белки NS (NS1 и NS2 или NEP) кодируются 8-м сегментом генома (длиной примерно 690 нуклеотидов 363 нуклеотида или соответственно 230 аминокислот и 121 аминокислота).



Рис. 1. Схематическое изображение строения вириона гриппа А.

Fig. 1. Schematic representation of the structure of the influenza A virion.

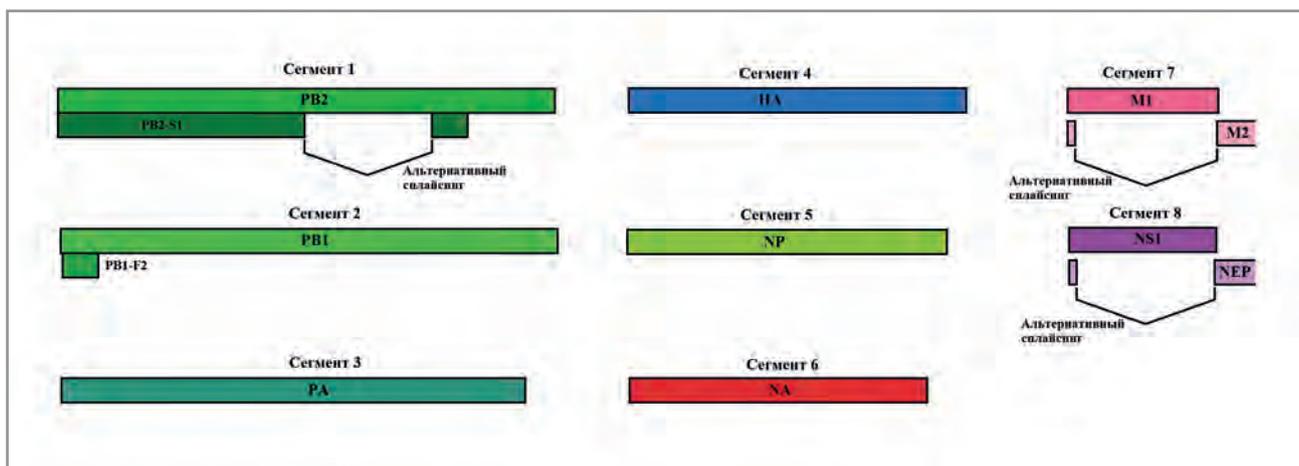


Рис. 2. Схематичное изображение сегментов генома вируса гриппа А.

Fig. 2. Schematic representation of the influenza A virus genome segments.

В международной системе International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV Taxonomy) отображая геном вируса гриппа принято перечислять сегменты вирусной РНК в указанной последовательности [4] (рис. 2).

Полимеразный комплекс

Первые три сегмента генома гриппа А являются матрицами для вирусного полимеразного комплекса, содержащего белки PB2, PB1 и PA. Совместно с вирусной РНК (вРНК или vRNA), упакованной в комплекс путём связывания с белком NP, данные белки формируют рибонуклеопротеин (RNP), который является транскрипционным и репликационным аппаратом вируса гриппа (рис. 3). Щелочные белки полимеразного комплекса PB1 и PB2 и кислый белок PA, собираясь в структуру тримера, представляют собой вирусную полимеразу, где С-конец белка PA связывает N-конец белка PB1, а С-конец белка PB1 связывает N-конец белка PB2. Белок PB1 представляет собой активный участок для связывания 5' и 3' терминальных концов вРНК и кРНК.

PB2 — один из самых длинных сегментов вируса гриппа А, кодирует одноимённый вирусный белок PB2 с длиной последовательности 757 аминокислотных остатков (ам. о.). Механизм действия PB2 заключается в отщеплении 5'-концевых фрагментов клеточных мРНК размером 13 нуклеотидов (cap-snatching) [5, 6, 29]. PB2 обладает сайтом распознавания и связывания кэп-структур клеточных мРНК, расположенным в участке аминокислотной последовательности 318–483, где он связывает клеточную мРНК. Кэп-промотор — это m7GpppX, несущий положительный заряд на метильной группе в 7-м положении.

PA — субъединичный полимеразный белок с последовательностью длиной 716 ам. о., проявляющий эндонуклеазную активность: он отре-

зает кэп-структуру клеточной мРНК и связывает этот образовавшийся промотор с вирусной РНК на 3'-конце.

PB1 — субъединичный белок гетеротримера с последовательностью белковой цепи 757 ам. о., является основным каталитическим компонентом, распознающим вРНК и кРНК и ведущим синтез новой нуклеотидной цепи.

Помимо этого PB2 также содержит две области, которые связывают NP — белок упаковки РНК, а также содержит сайт связывания с белком PB1. Области PB2, ответственные за связывание NP и PB1, обнаруживают значительное перекрытие, и связывание NP с фрагментами PB2 может быть вытеснено PB1. Связывающие домены PB2 действуют как ингибиторы экспрессии вирусных генов, и в соответствии с данными связывания *in vitro* их ингибирующая активность зависит от концентрации PB2, NP и PB1. Это означает, что белки PB2 и NP совместно являются регуляторами переключения процессов транскрипции и репликации [5, 6].

PB1-F2 является факультативным белком, считываемым с альтернативной рамки считывания второго сегмента генома вируса гриппа. Белок PB1-F2 способен встраиваться во внешнюю и во внутреннюю мембраны митохондрий, вызывая формирование сквозных пор. В результате такого взаимодействия из митохондрий высвобождается цитохром С, запуская процесс апоптоза. Выявлено, что PB1-F2 приводит к повышению вирулентности штаммов вируса гриппа и их экологической пластичности, то есть способности преодолевать межвидовой барьер [6].

Репликация вирусной РНК начинается и заканчивается в определённых сайтах.

Характерной особенностью воспроизведения вРНК РНК-зависимой РНК-полимеразой является невозможность исправления ошибок во время соединения нуклеотидов, что является причиной

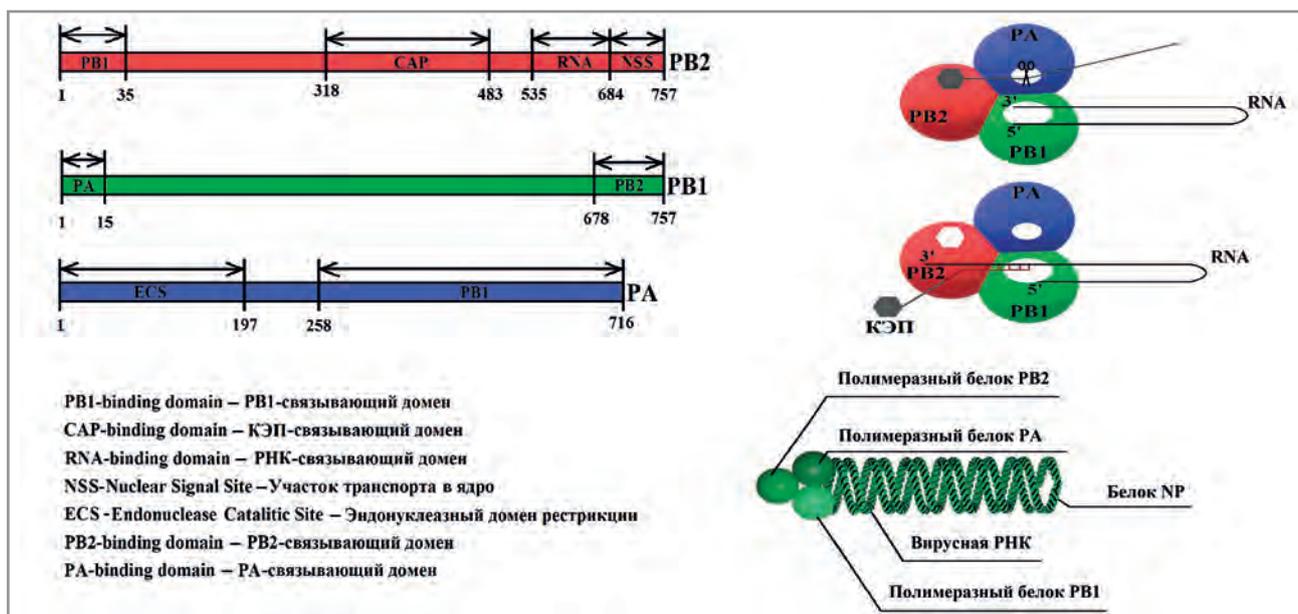


Рис. 3. Схематичное изображение сегмента генома вируса гриппа — рибонуклеопротеида, сформированного комплексом белков PB2, PB1, PA, NP и вирусной РНК.

Fig. 3. Schematic representation of an influenza virus genome segment — a ribonucleoprotein formed by a complex of proteins PB2, PB1, PA, NP, and viral RNA.

мутаций вируса, ускоряющих его эволюцию и зачастую увеличивающих его вирулентность [5, 6].

Описаны аминокислотные замены, играющие роль «переключателя» вирусного тропизма с птиц на млекопитающих: E627 → K, D701 → N в PB2, S714 → R в PB2, L13 → P и S678 → N в PB1, K615 → N в PA [6].

Гемагглютинин

Гемагглютинин (Н или HA) — мембранный белок вируса гриппа (размер 13,5 нм, молекулярная масса ≈76 кДа). Он представляет собой тример в виде выроста грибовидной формы на поверхности липидной мембранной оболочки вируса (рис. 1, 4) [18, 30].

Гемагглютинин является рецептором вирусной частицы, необходимым для прикрепления и проникновения в поражаемую клетку. Это самый многочисленный из белков оболочки составляет примерно 80% от всех поверхностных белков. Степень заражения организма определяется свойствами гемагглютинина [5, 6, 18, 30, 31].

Мономеры гемагглютинина синтезируются отдельно как предшественники HA в виде последовательности длиной 570 аминокислот, которые протеолитически разделяются на две субъединицы HA1 и HA2. Предварительно в ядре заражённой клетки с матрицы РНК синтезируются предшественники HA0, далее они протеолитически расщепляются на три структуры гемагглютинина и формируют булавоподобный пепломер [30, 31]. Верхушка пепломера состоит из

антипараллельных β-слоёв участка субъединицы HA1, а нижние части этой структуры состоят из трёх спирально-закрученных α-спиралей. Субчастица HA1 имеет глобулярную или овоидную форму и несёт на себе RBS (receptor binding site) — участок связывания вириона с рецептором клетки — мишени. RBS сформирован тремя участками аминокислот — петлями и спиральями, образующими своего рода углубление или карман [28, 32, 33].

Инициация инфекционного процесса происходит путём взаимодействия RBS глобулярной части гемагглютинина с рецептором на клетках — мишенях, что приводит к их химическому взаимодействию и дальнейшему внедрению вириона в клетку с образованием везикулы через клатрин-опосредованный путь или кавеолин-независимый путь.

Стебельковая часть гемагглютинина HA2 несёт в себе прежде всего гидрофобный пептид слияния FP (Fusion Peptide), ответственный за закрепление гемагглютинина в мембране эндосомы и участие в последующем образовании поры в ней. Также стебельковая часть имеет трансмембранный домен ТМ (Transmembrane Domain), который удерживает эту часть гемагглютинина в оболочке вириона [34, 35].

Большинство типов HA пневмотропны, что связано со специфичностью фермента триптазы, расщепляющей синтезируемый белок непосредственно в лёгких, однако замечено, что H5 и H7 являются пантропными птичьими вариантами, способными поражать различные виды органов и тканей [5, 6, 13, 36].

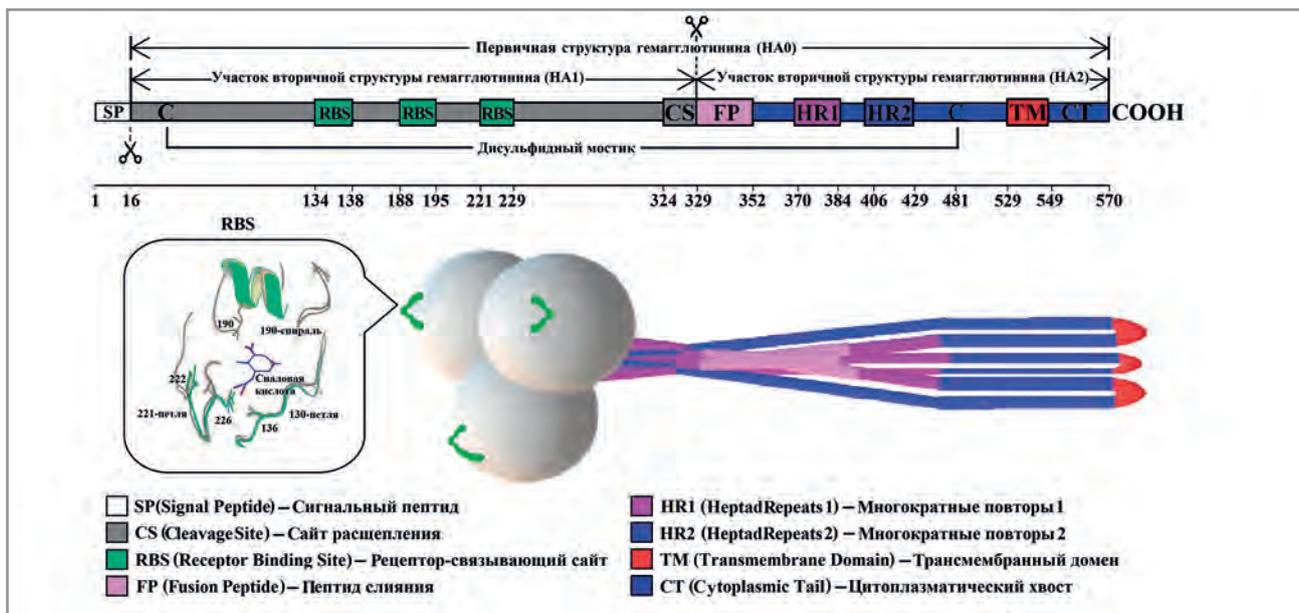


Рис. 4. Строение белка гемагглютинаина: схематичное отображение специфических сайтов белка на генетической карте его РНК-сегмента и его четвертичная структура (цветом обозначено местоположение того или иного участка согласно его генетической карте и конформации).

Fig. 4. The structure of hemagglutinin protein: a schematic display of specific protein sites on the genetic map of its RNA segment and its quaternary structure (the color indicates the location of a particular site according to its genetic map and conformation).

Различие в способности расщепиться эндогенными протеазами зависит от аминокислотного состава сайта протеолитического нарезания HA: низкоковирулентные варианты гриппа А птиц содержат 1 или 2 положительно заряженных основных остатков аминокислот в сайте расщепления (CS), например, PQ...RETR|G (слабовирулентный грипп птиц H5); высококовирулентные варианты вируса гриппа А птиц имеют повышенное содержание положительно заряженных основных аминокислотных остатков PQRERRRKKR|G (высоковирулентный «гонконгский» грипп птиц H5N1). Высоковирулентные для человека пандемические штаммы содержат единичные положительно заряженные аминокислоты в участке CS, например, PS...IQSR|G (высоковирулентный «испанский» грипп H1N1). Это свидетельствует о том, что характеристики функционирования протеаз, расщепляющих HA₀ на две субъединицы, в различных хозяевах могут различаться. Вместе с тем, именно высококовирулентные варианты вируса имеют наибольшие шансы преодолеть межвидовой барьер [6, 37–39].

Ключевая роль столь специфического строения гемагглютинаина заключается не столько в закреплении вириона на поверхности клетки-мишени, сколько в механизме раскрытия внутриклеточной везикулы (рис. 5), несущей в себе вирион гриппа внутрь поражаемой клетки. Процесс

внедрения вирусной частицы в клетку рассмотрен далее.

В процессе продвижения эндосомальной везикулы, стенки которой пронизывают АТФ-зависимые протонные насосы, эти насосы активируются при высвобождении эндосомы от белка клатрина и начинают активно закачивать протоны внутрь. Возможно, поток протонов происходит в самый момент слияния вириона с эндосомальной мембраной, а эндосомальные ионные каналы препятствуют образованию положительного напряжения [5, 6].

В результате работы протонных каналов М2 происходит закисление (ниже рН 6,0) внутренней среды вириона. Для преобразования белковых структур достаточно изменения рН на 0,2 единицы. Протонирование приводит к изменению конформации гемагглютинаина таким образом, что глобулярная часть HA1 раскрывается, а стебельковая часть HA2, главным образом пептид слияния FP, резко выпрямляется по направлению к мембране эндосомы, где он заякоревается и становится опорой, субъединица HA2 остаётся заякоренной в липидной мембране вириона посредством С-концевого ТМ-домена, вокруг создавшейся гидрофобной оси из стебельковой части гемагглютинаина спирально сворачиваются глобулярные части белка (HA1), стягивая участки эндосомальной мембраны, что приводит к её инвагинации и дальнейшему формированию поры.

Через образовавшиеся поры внутреннее содержимое вириона, а именно — рибонуклеопротеиновые комплексы выходят и транспортируются непосредственно к месту репликации, то есть в ядро (см. рис. 5) [5, 6, 40].

Рецепторы клеток-мишеней

Рецепторами клеток-мишеней на поверхности эпителиальных клеток дыхательных путей у человека и животных, а также желудочно-кишечного тракта у птиц являются белки, интеркалированные в билипидную мембрану, наружная поверхность которых представлена остатком сиаловой (или нейраминовой) кислоты (рис. 6, 7) [5, 6, 33].

Нейраминовая кислота (NeuAc или sialic acid) чаще всего терминирована сахарами и представлена в виде N- и O-гликопротеинов. Другие типы сочетаний также представлены в живых организмах, но NeuAc — это основное соединение, являющееся рецептором, обнаруженное у человека. Ацетильные группы в данном соединении также могут быть представлены как O-ацетил, так и N-ацетил.

Гемагглютинин (НА) вируса гриппа А, поражающий человека, преимущественно распознаёт α -2,6-гликозидные связи на рецепторах клеток-мишеней, а вирусы гриппа птиц афинны к α -2,3-гликозидным связям. Аффинность к человеческому или птичьему типу рецептора задаётся составом аминокислот в НА.

Необходимо отметить, что клетки нижних дыхательных путей человека также несут α -2,3-сиаловые рецепторы, что предопределяет возможность заражения человека птичьими штаммами вируса гриппа [6, 41, 42].

В настоящее время самыми распространёнными гемагглютинином вируса гриппа в популяции людей являются Н1 и Н3. Гемагглютиныны Н5, Н7 и Н9 — это гемагглютиныны птичьего гриппа, которые способны вызывать заболевания у людей. Известно 18 типов гемагглютининов.

Мутационная изменчивость гемагглютинина

Любой вирус является облигатным паразитом, это означает, что вирус способен воспроиз-

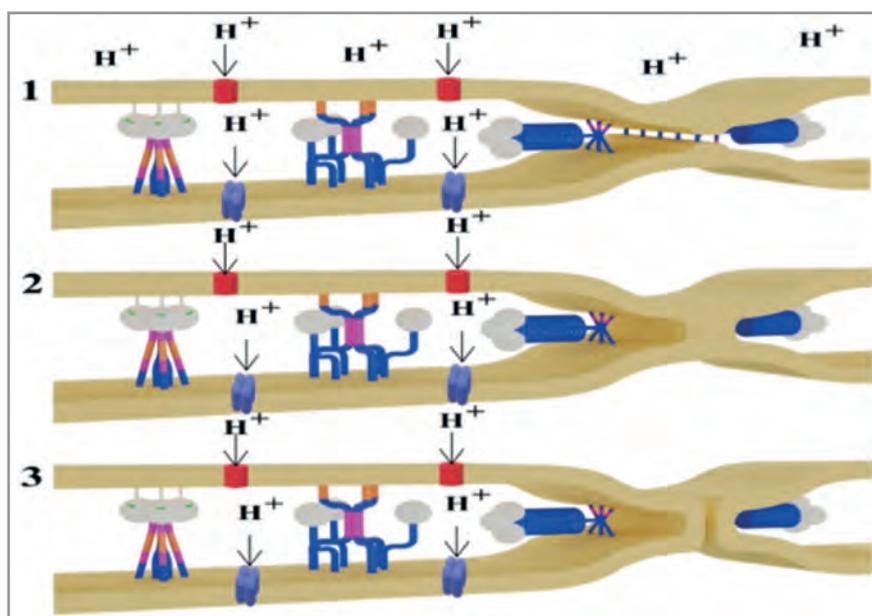


Рис. 5. Схематическое изображение преобразований гемагглютинина в процессе образования поры в мембране эндосомальной везикулы, в которой находится вирион гриппа А

Fig. 5. Schematic representation of hemagglutinin transformations during the formation of a pore in the membrane of the endosomal vesicle, which contains the influenza A virion.

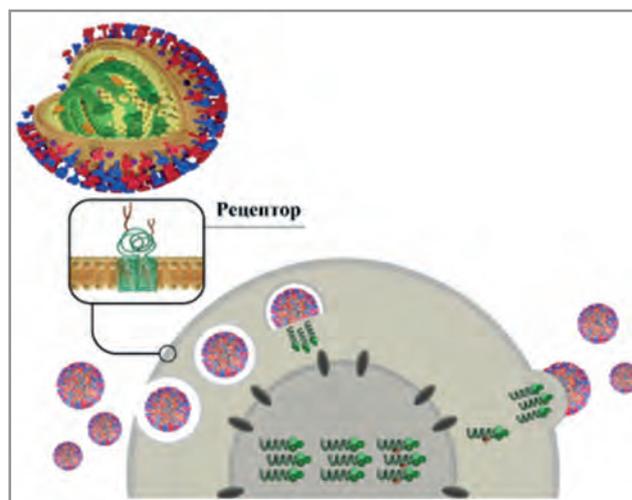


Рис. 6. Схематическое представление рецептора клетки-мишени.

Fig. 6. Schematic representation of a target cell receptor.

водить потомство только проникая внутрь клетки, где будет использовать ресурсы этой клетки, что является необходимой стадией его жизненного цикла. Проникновение вируса гриппа осуществляется путём взаимодействия его гемагглютинина с сиаловыми кислотами рецепторов поражаемых клеток [5, 6, 33].

В природе обнаружено 18 типов гемагглютининов. Такое множество обусловлено необходимостью приспособления белков вируса гриппа

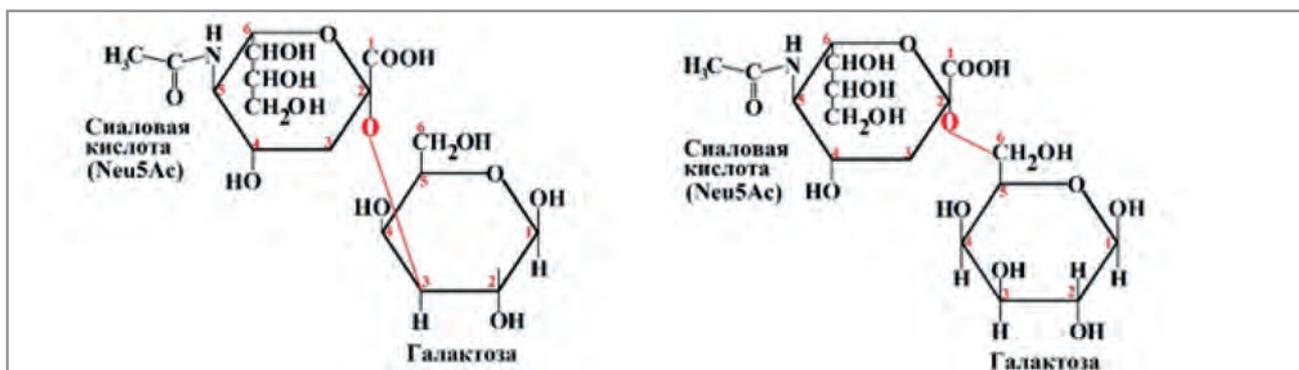


Рис. 7. Химическая формула концевых остатков рецепторов, распознаваемых гемагглютинином вируса гриппа А (слева — α -2,6-гликозид сиаловой кислоты; справа — α -2,3-гликозид сиаловой кислоты).

Fig. 7. Chemical formula of the terminal residues of the receptors recognized by the hemagglutinin of the influenza A virus (on the left — sialic acid α -2,6-glycoside, on the right — sialic acid α -2,3-glycoside).

для прикрепления к рецепторам и дальнейшего проникновения патогена внутрь клеток-мишеней большого многообразия живых организмов. В связи с тем, что живые организмы имеют общую биологическую, биохимическую, молекулярную и генетическую природу, несмотря на такое разнообразие биологические структуры имеют во многом консервативное строение. Белковой природе антигенных детерминант гриппа это также свойственно. Мутационная изменчивость возможна только в пределах определённых точечных замен, когда незначительно изменяется нуклеотидная последовательность в определённых локусах РНК, соответственно приводя к преобразованию конформационной структуры белка в этих локусах [22].

Так, например, некоторые конформационные изменения ведут к abortивному процессу взаимодействия вирусной частицы и клетки-мишени, когда вирус не может проникнуть внутрь, и соответственно такие изменения не приводят к закреплению этих преобразований в генотипе в виде вирусного потомства [6, 22, 43]. В то время как другие точечные замены ведут к увеличению сродства между вирусной частицей и рецептором поражаемой клетки. Примером может служить появление гемагглютининов вируса гриппа А, прикрепляющихся к α -2,3- и α -2,6-сиаловым кислотам, что возможно при замене Q226 → L226. Возможные варианты аминокислотных замен гемагглютинина, приводящих к вариациям в его строении и специфичности, известные на данный момент представлены в табл. 1.

Таким образом, строение аминокислотной последовательности гемагглютинина относительно консервативно, в то же время возникающие точечные замены могут существенно изменять свойства вируса иногда полностью изменяя специфичность его рецептора и, соответственно, приводить к резистентности лекарственных препаратов.

Нейраминидаза

Нейраминидаза (N или NA) — это экзосиалидаза (EC 3.2.1.18) — фермент, обладающий гидролитической активностью. Нейраминидаза представляет собой второй поверхностный антиген вируса гриппа. Она ответственна за проникновение вируса через муциновый слой слизистой оболочки и отпочковывание вновь сформированных вирионов наружу из клетки хозяина путём отщепления сиаловой кислоты от поверхности клеток ферментативным путём, высвобождая новые вирионы [5, 6, 31, 44–47].

Нейраминидаза расщепляет α -кетозидную связь типа α 2–3, α 2–6 и α 2–8 между терминальным остатком сиаловой (N — ацетилнейраминовой) кислоты и D-галактозамина или D-галактозы. Оптимум pH для NA лежит в пределах 6,4–7,0 при гидролизе α 2–3-связей, и в пределах 4,5–7,0 при гидролизе α 2–6-связей [5, 6, 33, 48].

Полипептидная цепь NA вируса гриппа состоит из 470 аминокислотных остатков. В третичной структуре NA можно выделить несколько структурно-функциональных доменов: цитоплазматический, трансмембранный, «голову», а также «стебель», соединяющий голову фермента с транс-мембранным доменом.

На поверхности вириона NA представляет собой гомотетрамер, имеющий грибообразную форму, — голова на тонком стебле. В голове NA расположен активный центр, а также кальций — связывающий домены, который стабилизирует структуру фермента при низких значениях pH. Молекулярная масса мономера \approx 60 кДа, тетрамера \approx 240 кДа (рис. 8). Тетрамеры могут собираться в кластеры на поверхности вириона.

Одна вирусная частица несёт в среднем 500–900 пепломеров NA_3 и 100–200 NA_4 . При этом формула состава поверхностных белков гриппа представляет собой соотношение $NA_3 : NA_4 = 4-5 : 1$ [6, 47].

Таблица 1. Специфичность аминокислот гемагглютинаина в указанных положениях и их эффекты, оказываемые на взаимодействия рецептора и гемагглютинаина

Table 1. Specificity of hemagglutinin amino acids at the indicated positions and their effects on receptor-hemagglutinin interactions

Аминокислота и её местоположение в первичной структуре HA (стрелкой указаны аминокислотные замены)	Эффекты взаимодействия рецептора клетки-мишени и гемагглютинаина (HA)
Y98→F98	Данная аминокислотная замена приводит к тому, что гемагглютинин не способен связываться с рецепторами Neu5Ac
H183→F183	Данная аминокислотная замена приводит к тому, что гемагглютинин не способен связываться с рецепторами Neu5Ac
L194→A194	Данная замена приводит к тому, что гемагглютинин не способен связываться с рецепторами Neu5Ac
W153→A153	Подобная замена приводит к конформационным изменениям, в результате которых гемагглютинин не проявляется на поверхности мембраны зараженной клетки
E190 → D190	Пример переключения специфичности сайта связывания рецептора с птичьего варианта рецептора α -2,3-Neu5Ac на α -2,6- Neu5Ac, это позволило вирусу гриппа А приобрести средство к клеткам-мишеням человека, что вызвало пандемию «испанского гриппа».
E190	Аминокислота в данном положении характерна для штаммов утиного происхождения.
K193 или R193	Данные аминокислоты в эпитопах приводят к средству к сульфатированным рецепторам, что свойственно вариантам H5 и H7 от кур, H13 и H16 от чаек, H3 от лошадей
Q226 → L226	Данная аминокислотная замена у H3 гемагглютинаина приводит к способности связывать α 2-6 связанные сиаловые кислоты, что свойственно эпидемическим штаммам
L226 → Q226	Данная замена приводит к переключению специфичности рецептор-связывающего сайта с α 2-6 на α 2-3 связь
A190, V190	Алифатические гидроксильные (T190) или кислотные (D190) боковые группы предопределяют средство гемагглютинаина к птичьим или человеческим рецепторам
T190, D190	Аминокислоты в этом положении несут свойство средства к человеческим рецепторам
G228 → S228	Данные аминокислоты в HA (H2) и HA (H3) способствуют повышению аффинности к α 2-6-рецептору
R329Q	Сайт расщепления для протеаз, конформационные изменения в котором приводят к созреванию гемагглютинаина и его фузионной активности, то есть определяет патогенность
G225 → D225	Появление аффинности к α 2-6-рецептору у вариантов «испанского гриппа»
Эпитопы 136, 190, 193, 216, 221, 222, 225, 226, 227 и 228 а. о.	Замены аминокислот в данных эпитопах могут влиять на изменение рецепторной специфичности
Q30 → N30	Мутации, искусственно полученные в лабораторных условиях <i>in vitro</i> , приводящие к резистентности к арбидолу
Q42 → H42	
K51 → N51	
K121 → R121	

Голова представляет собой большой домен, состоящий из четырёх идентичных антипараллельных β -слоёв (мотивов), организованных в пропеллероподобную структуру. Наиболее важными для функционирования фермента являются петли активного центра этих мотивов, а также Ca^{2+} -связывающий домен, расположенный в непосредственной близости к активному центру. Петли являются наиболее вариабельной частью структуры всех HA, варьируя по длине и даже неся элементы упорядоченности, типичные для вторичной структуры.

Сайт связывания нейраминовой кислоты (Neu5Ac) расположен «над» первыми тяжами третьего и четвёртого мотивов, в большом кармане на поверхности HA. Активный центр находится на N-конце центральных параллельных тя-

жей. Он представляет собой углубление в центральной части диаметром 16 Å и глубиной от 8 до 10 Å, расположенное на расстоянии 32 Å от оси симметрии четвёртого порядка. Сайт фланкирован двенадцатью гибкими петлями, которые тянутся вверх и наружу от этой оси.

Активные центры фермента расположены на наружной части глобулярных участков головного фрагмента нейраминидазы и сформированы функциональными аминокислотными остатками, которые контактируют непосредственно с продуктом ферментативной реакции — сиаловой кислотой, а все образуемые ими контакты полярны.

В головной части фермента имеется кальций-связывающий домен, необходимый для стабилизации фермента при низких значениях pH [18, 37, 44].

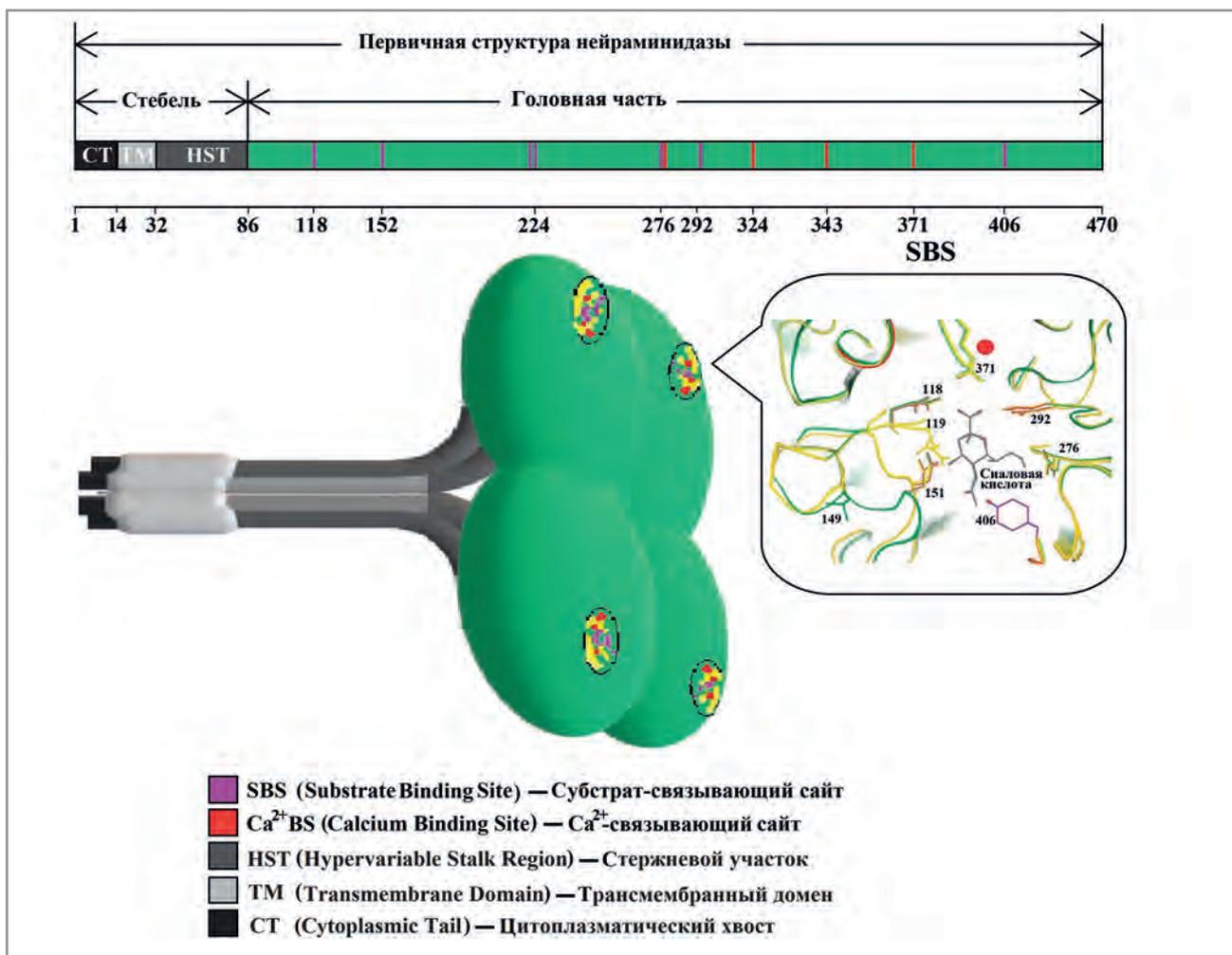


Рис. 8. Генетическая и структурная модель нейраминидазы с сайтами специфичности.
Fig. 8. Genetic and structural model of neuraminidase with specificity sites.

Особенностью стеблевой части НА является её высокая мутационная изменчивость, которая приводит к более или менее продуктивному высвобождению вирионов гриппа из инфицированной клетки, а также является фактором иммуногенности. Исследования показали, что длина стеблевой части НА имеет прямое влияние на высвобождение вирионов на стадии выплывания: вирионы с удлинёнными стеблевыми частями имеют более высокую способность к репродукции, а также более высокую тропность к поражаемым тканям, тогда как вирусные частицы с укороченными стеблями в опыте на культурах тканей показали меньший выход вируса и низкую вирусную нагрузку [5, 6].

У вирусов гриппа А насчитывается одиннадцать подтипов НА, у вирусов В, С и D — только по одному. Девять подтипов нейраминидазы вируса гриппа А разделяют на две филогенетические группы. В первую входят нейраминидазы подтипов N1, N4, N5 и N8, а вторую — N2, N3, N6, N7 и N9, отдельно стоит подтип N10 и N11 летучих мышей [2–4, 18, 25, 29, 40, 41, 48].

Точечные мутации нейраминидазы в наиболее важных сайтах этого фермента приводят к устойчивости вирусов сезонного гриппа к ингибиторам нейраминидазы. Далее в табл. 2 показаны эффекты аминокислотных замен на функциональные изменения данного белка, повышающие резистентность вируса гриппа к препаратам [6, 26, 43].

Нуклеопротеин

Нуклеопротеин (NP) — глобулярный белок упаковки вирусной РНК, основной функцией которого является инкапсидация вирусного генома. Каждый сегмент РНК вируса гриппа инкапсидирован нуклеопротеинами (NP) с образованием рибонуклеотиднуклеопротеиновых (РНП) комплексов. Вокруг цепочки белка NP одна цепь «минус» РНК — сегмента компактно упакована таким образом, что образует комплексы рибонуклеопротеидов с РНК (см. рис. 3). Структура сегмента представляет собой тримерный комплекс, состоящий из головки, тела и хвостика, где головка — это по-

Таблица 2. Специфичность аминокислот нейраминидазы в указанных положениях и их эффекты, оказываемые на взаимодействия белка NA и ингибиторов нейраминидазы

Table 2. Specificity of neuraminidase amino acids at the indicated positions and their effects on the interactions of the NA protein and neuraminidase inhibitors

Аминокислота и её местоположение в первичной структуре NA (стрелкой указаны аминокислотные замены)	Эффекты, происходящие в результате изменений аминокислотного состава в нейраминидазе (NA)
H275 → Y275 (или H274 → Y274)	Данная мутация у штаммов H1N1 приводит к устойчивости к осельтамивиру в результате модификационной изменчивости активного центра NA
V234 → M234 R222 → Q222	Вторичные мутации, которые привели к появлению резистентных вариантов H275 → Y275 в сезонном гриппе A(H1N1)
R292 → K292	Данная замена показала снижение чувствительности к ингибиторам нейраминидазы у штаммов H3N2.
G248 → 248R I266 → 266V	Данные аминокислотные замены в вариантах N1 ведет к резистентности как к осельтамивиру так и занамивиру в штаммах гриппа A(H1N1)
Y155 → H155	Данная аминокислотная замена в вариантах N1 ведет к резистентности к осельтамивиру и занамивиру в штаммах гриппа A(H1N1), в то время как занамивир был создан на основе варианта H1N2 с заменой H155, где он проявлял свою эффективность
Q226 → H226 E41 → G41	Данная аминокислотная замена в вариантах N2 ведет к резистентности как к осельтамивиру так и занамивиру у штаммов H3N2 и H1N2.
E99 → V99 H255 → Y255 R273 → K273 N275 → S275	Мутации аминокислот в нейраминидазе N1, приводящие к резистентности к осельтамивиру у штамма H1N1.

лимеразный комплекс, состоящий из белков PB2, PB1 и PA, а тело и хвостик — это комплекс вирусной РНК и нуклеопротеина NP. Упаковка vРНК при помощи белка NP напоминает структуру бусин, нанизанных на нить, где vРНК — это условно «нить», а белок NP — «бусины» (см. рис. 3) [5, 6].

Белок NP имеет способность к олигомеризации и задействован в процессах транскрипции вирусного генома, репликации, упаковки его в вирионы. Белок NP способен взаимодействовать со многими макромолекулами: с вирусными белками полимеразного комплекса PB1 и PB2, матричным белком M1, а также с клеточными полипептидами: α -импортином, F-актином, рецептором ядерного экспорта CRM1. Экспериментально показана роль белка NP в адаптации вирусов гриппа к организму-хозяину [5, 6].

Матричные белки M1 и M2

Белок M1 — глобулярный белок удлиненной формы, размером 27,8 кДа и длиной белковой цепи 252 аминокислотных остатка. M1 выстилает изнутри вирусную оболочку, представляющую собой липидный слой, заимствованный у клетки-мишени, и формирует под ней структурный слой. Структура данного белка организована следующим образом: она содержит три домена — мембраносвязывающий домен, участок регуляции внутриядерного транспорта вирусного РНП и участок связывания с рибонуклеопротеиновыми комплексами [5, 6, 21, 49].

Матричный белок M1 полифункционален: он участвует в синтезе новых вирусных РНП-комплексов, участвует в их транспорте из ядра в цитоплазму к месту сборки нового вириона, а также является организующим белком для формирования его оболочки, то есть обеспечивает целостность вирусной частицы. Вероятно, основным переключателем конформационных изменений белка M1 является значение pH.

Белок M1 взаимодействует и находится в комплексе с небольшим количеством белка NS2 или NEP.

Оба матричных белка M1 и M2 считываются с 7-го сегмента РНК путём альтернативного сплайсинга, где только первые 9 аминокислот являются общими для двух белков.

Белок M2 — это трансмембранный белок оболочки вируса гриппа. Он является самым маленьким по размеру из известных на сегодняшний день белков: $\mu(M2) \approx 11$ кДа, он упаковывается в структуру тетрамера $\mu(M24) \approx 44$ кДа, образуя гидрофильный канал через липидный бислой (рис. 9). Через этот канал определённые неорганические ионы могут диффундировать по своим электрохимическим градиентам. Каналы обычно закрыты и открываются только в ответ на определённый стимул, например, на изменение мембранного потенциала (потенциал-управляемый канал) или связывание лиганда (лиганд-управляемый канал) [6, 49].

Первичную конформацию данного белка составляет цепь из 97 аминокислот, полученная пу-

тём альтернативного сплайсинга с 7-го сегмента генома вируса гриппа. В процессе активной работы фрагменты серина 31 (S31) и имидазольного кольца гистидина в позиции 37 (H37) перераспределяют между собой протоны и переносят эти протоны внутрь вириона.

В процессе функционирования М2 происходит ацидификация внутреннего содержимого эндосомы, содержащей вирион, транспортирующей его к месту репликации. Считается, что приток протонов внутрь вириона нарушает взаимодействия между матричным белком М1, вирусным РНП и липидными бислоями, тем самым освобождая вирусный геном от взаимодействия с вирусными белками и позволяя сегментам РНК мигрировать в ядро клетки-хозяина, где происходят транскрипция и репликация РНК вируса гриппа. Также М2 играет роль при секреции вирусных белков, повышая внутривезикулярный рН обычно кислых компартментов, таких как аппарат Гольджи, предотвращая преждевременное переключение новообразованного гемагглютинина в активную конформацию слияния [14, 20, 40].

В посттрансляционных изменениях М2 встраивается в матрикс билипидной мембраны заражённой клетки-мишени для участия в процессе последующего выпоноковывания новых вирионов и выходом сегментов вирусных РНП в цитоплазму и далее в ядро.

Процесс входа вируса в клетку хозяина, раскрывания вирусной частицы и дальнейшее воспроизводство рибонуклеопротеидов требует координированного взаимодействия между белками М1 и М2 [14, 21].

Мутации отдельных нуклеотидов (как в случае S31 → N31 (AGT → AAT), приводящие к заменам аминокислот в последовательности белка М2,



Рис. 9. Генетическая и структурная модель белка М2 с сайтами специфичности.

Fig. 9. Genetic and structural model of the M2 protein with specificity sites.

способные приводить к устойчивости к лекарственным препаратам, рассмотрены в табл. 3 [49].

Неструктурные белки (NS1 и NS2)

NS1 — это гомодимерные РНК-связывающие белки размером 26 кДа и длиной цепи 230 ам. о. Структура белка включает в себя сайт связывания и полимеризации РНК, участок ядерной локализации, участок ядерного транспорта и два сайта ингибирующей активности клеточных белков иммунного ответа и созревания клеточных РНК [5, 6].

Белки NS1 вовлечены в регуляцию многих процессов в клетке-мишени: они подавляют экспорт мРНК клетки-хозяина в цитоплазму, то есть

Таблица 3. Специфичность аминокислот матричного белка М2 в указанных положениях и их эффекты, оказываемые на взаимодействия рецептора и гемагглютинина

Table 3. Amino acid specificity of the M2 matrix protein at the indicated positions and their effects on the interactions of the receptor and hemagglutinin

Аминокислота и её местоположение в первичной структуре HA (стрелкой указаны аминокислотные замены)	Эффекты, происходящие в результате изменений аминокислотного состава в матричном белке М2
V/I27, A30, S31 и G34	Данные аминокислоты определяют устойчивость структуры внутренней поверхности М2-канала. Замены в этих позициях могут приводить к устойчивости к М2-блокаторам.
L26 → I26	Мутации, приводящие к резистентности к М2-блокаторам
V/I27 → G/A/S/T27	
A30 → V/T/S/P30	
S31 → N31	
G34 → E34	Такие замены приводят к неспособности формировать протон-селективные каналы
H37 → G37	
H37 → S37	
H37 → T37	

угнетают процесс транскрипции и формирования нормальных белков поражаемой клетки; они ингибируют полиаденилирование мРНК клетки-хозяина, то есть нарушают созревание РНК поражённой клетки; они ингибируют сплайсинг мРНК и опосредованный иммунный ответ. NS1 снижает концентрацию как синтетических, так и лёгочных провоспалительных цитокинов [5]. Таким образом, функция данных белков — это нарушение всех нормальных процессов в заражаемой клетке.

В ядре инфицированных эукариотических клеток с альтернативной рамки считывания 8-го сегмента также синтезируется белок NS2 или NEP. NEP участвует в работе белково-полимеразного комплекса вируса во время репликации и вовлечён в транспорт РНК в цитоплазму [5].

Жизненный цикл вируса гриппа А

В настоящее время в человеческой популяции циркулируют различные субтипы вирусов гриппа, чаще всего это H1N1 и H3N2. Инкубационный период составляет от 24 ч до 72 ч. Вирусы гриппа инфицируют и воспроизводятся в столбчатых эпителиальных клетках респираторного тракта человека, свиней, кошек, собак, лошадей и других животных, а также желудочно-кишечном тракте птиц, что обусловлено наличием специфических рецепторов в клетках систем органов. Это α -2,3-сиалозидазы и α -2,6-сиалозидазы (рис. 10) [6, 28].

1. Рецептор-опосредованный вход вирусной частицы в клетку-мишень. Для защиты от проникновения чужеродных частиц в организмах животных и человека существуют барьеры, препятствующие проникновению вируса в клетки. Первым барьером на пути вирусных частиц является вязкая слизь, которая в норме вырабатывается клетками эпителия дыхательных путей или желудочно-кишечного тракта.

Слизь — это высокомолекулярные гликопротеины, связанные с сиаловой (или N-ацетилнейраминной) кислотой, которые являются своего рода ложными рецепторами для вируса, функциональное назначение этих гликопротеидов — служить препятствием для проникновения вируса в клетку.

Находящаяся на поверхности вириона нейраминидаза NA позволяет ему пройти сквозь защитный слой слизи путём отщепления нейраминной кислоты от сиалозидов, «расчищая путь» для прикрепления гемагглютинаина HA вирусной частицы непосредственно к рецепторам клеточной мембраны клетки-мишени [6].

Пройдя через барьер слизи, вирусная частица продвигается к клетке-мишени, а затем в процессе взаимодействия белков вируса с клеткой запускается каскад событий, многократно увеличивающий количество вирусных частиц, повышая вирусную нагрузку.

2. Начало процесса эндоцитоза. Эндоцитоз начинается с контакта гемагглютинаина (HA) с сиаловым рецептором клетки-мишени путём химического взаимодействия лиганд рецептор-связывающего сайта (RBS) на глобулярном домене HA, что активизирует адапторные белки, связанные с рецепторами в цитозоле клетки для формирования впячивания мембраны. Это первый этап рецептор-опосредованного эндоцитоза, который способствует продвижению вириона внутрь клетки.

3. Клатрин-опосредованное формирование эндосомы. Далее адапторные белки соединяются с белком клатрином и запускают на внут-

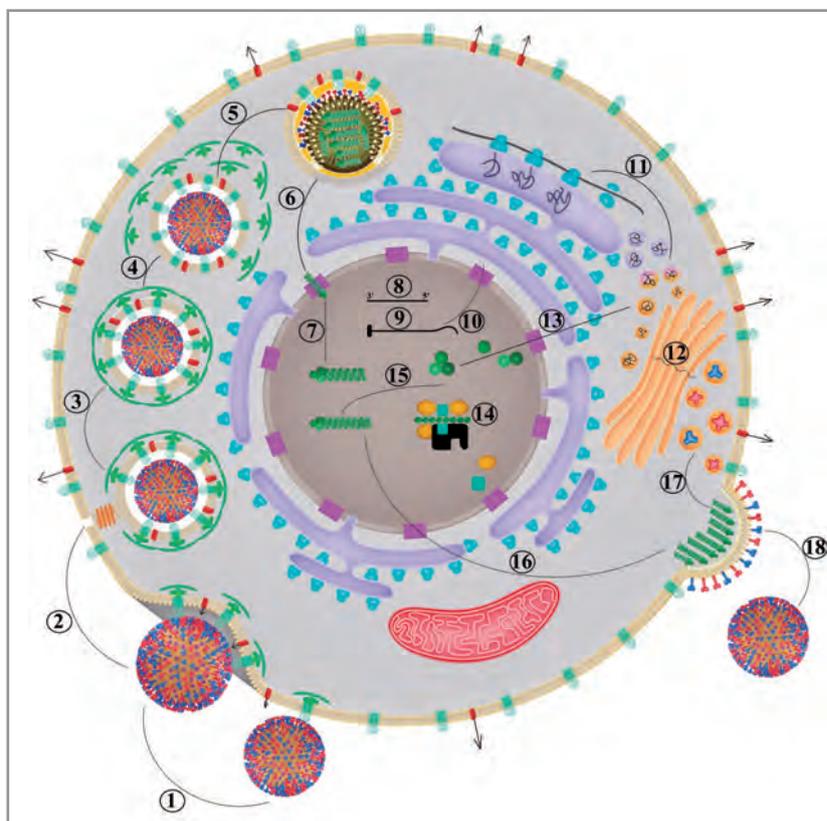


Рис. 10. Жизненный цикл вируса гриппа А (от стадии прикрепления к клетке-мишени до отпочковывания нового вириона).

Fig. 10. Life cycle of influenza A virus (from the stage of attachment to the target cell to the budding of a new virion).

ренней поверхности плазматической мембраны процесс образования клатринового мультимера, формирующего характерную инвагинацию или ямку, окаймлённую клатрином. Отрезающий мембранный белок динамин отщипывает окаймлённую клатрином ямку, образуя таким образом покрытую клатрином везикулу [5, 6].

4. Продвижение вириона внутрь клетки. В таком виде окаймлённая клатрином внутри везикулы вирусная частица продвигается к ядру. Впоследствии везикула высвобождается от клатринового каркаса с помощью белка ауксиллина, формируясь эндосома.

5. Ацидификация протонными помпами. Протонные помпы — это H^+/K^+ -АТФазы — энергозависимые ферменты, осуществляющие перенос ионов сквозь канал, который формируется трансмембранными петлями белка, активный центр которого гидролизует АТФ с активным переносом протонов против электрохимического градиента.

Таким образом получается, что эндосома, внутри которой находится вирион гриппа представляет собой вирусный геном покрытый двумя оболочками: собственной оболочкой вируса и оболочкой клетки — мишени. Собственная вирусная оболочка пронизана ионными каналами (M2) [49]. Эндосомальная оболочка, сформированная цитоплазматической мембраной клетки, несёт в себе протонные насосы, которые закачивают протоны внутрь.

6. Слияние оболочек эндосомы и вириона. Благодаря работе протонных насосов, встроенных во внешнюю оболочку эндосомы, внутренняя среда закисляется. Ацидификация эндосомы от pH 6,0 до pH 5,0-5,5 приводит к продвижению протонов через ионный канал M2 внутрь вириона. Сдвиг pH в кислую сторону вызывает нарушение конформации белка оболочки вируса M1, и оболочка вириона разрушается — формируется пора слияния между оболочкой самого вириона и эндосомы. Увеличение концентрации ионов H^+ также приводит к конформационным изменениям гемагглютинина: его структура изменяется таким образом, что глобулярные части расходятся, а стеблёвые части заякореваются в мембране эндосомы и растягивают её в разные стороны, образуя пору (см. Гемагглютинин и рис. 5). Вследствие данного процесса происходит выход вирусного генома в эндосому, а конформационные изменения в гемагглютинине (см. выше) приводят к образованию поры в эндосоме, через которую генетический аппарат вируса выходит в цитоплазму хозяйской клетки.

7. Перемещение вирусного генома в ядро. Далее нуклеопротеиновые комплексы, которые представляют собой сегментарный геном вируса гриппа А, состоящий из 8 сегментов, перетаски-

ваются белками клетки α - и β -кариоферинами в ядро, где происходит распаковка вирусного генома и последующие транскрипция и репликация [6].

8. Инициация транскрипции и репликации. Вирусная РНК (вРНК) гриппа имеет отрицательную полярность. Поскольку такая вРНК — не может непосредственно служить матрицей для синтеза белка и воспроизводства новых вРНК, поэтому сначала с вирусной РНК считывается информация для формирования матричной РНК (мРНК) для последующей трансляции, образуемая комплементарная РНК (кРНК) положительной полярности служит основой для дальнейшего процесса воспроизведения вируса.

9. Транскрипция. РНК-зависимая РНК-полимераза — это праймер-зависимый фермент, состоящий из трёх белков PA, PB1 и PB2, главной функцией которого — синтез новой полинуклеотидной цепи [5, 6]. В качестве праймера для этого фермента служит клеточная пре-мРНК хозяйской клетки: PB1 связывает 5'-конец вирусной РНК, активируя PB2 и заставляя 3'-конец вирусной РНК образовывать двуцепочечную зону с 5'-концом клеточной мРНК. PB2 связывает N7-метилгуанозин на 5'-конце клеточной мРНК с вирусной РНК. Субъединица PA отщепляет последовательность 13 нуклеотидов от кэп-структуры клеточной мРНК посредством эндонуклеазной активности на N-конце, точное место расщепления зависит как от расстояния между PB2 и PA рибонуклеопротеинового комплекса (около 50 ангстрем или 10–13 нуклеотидов), так и от последовательности мРНК (см. рис. 3) [14, 29].

10. Элонгация и прерывание транскрипции. Кэп-праймер перемещается через выходной туннель продукта в домене PB1 и служит праймером для транскрипции. Субъединица PB1, осуществляя свою полимеразную активность и постепенно добавляя нуклеотиды. Далее происходит элонгация цепи вирусной мРНК, которая в результате описанных событий содержит на своём 5'-конце 10–13-членный фрагмент, не имеющий аналога в составе вРНК (см. рис. 3) [5, 6].

При этом полимеразный комплекс PB2-PB1-PA сохраняет постоянную связь с 5'-концом вРНК и, продвигаясь в процессе транскрипции от 3'- к 5'-концу вРНК, постепенно сокращает размер «петли», включающей ещё нетранскрибированный участок вРНК [5, 6].

Многие РНК-вирусы отрицательной полярности полиаденилируют свои мРНК путём прерывания полимеразного механизма во время транскрипции. Стоп-сигнал, представленный в конце каждого гена, образован участком, состоящим из Урацила, на котором вирусная полимеразная получает информацию о прерывании: после каждой Адениновой вставки, она возвращается

на один нуклеотид обратно вдоль цепи мРНК. Это возобновляет транскрипцию, добавляя новый Аденин, затем снова возвращается обратно. Таким образом Урацил в шаблоне генома копируется сотни раз в конце вирусной мРНК, таким образом синтезируя поли-А-хвост.

В конечном счёте полимеразы воспроизведёт полиаденилированную мРНК и остановит транскрипцию или сканирует, чтобы перезапустить следующий ген.

Происходит следующее: последние 16 н. о. на 5'-конце вРНК связаны с РВ1, и когда полимеразный комплекс доходит до этого места, он не имеет возможности двигаться дальше. Однако полимеразный центр РВ1 продолжает синтезировать poly(A), несколько раз проходя по матрице пентамера poly(U), который примыкает к 5'-концевому 16-членному участку вРНК, связанному с РВ1. Таким образом, в то время, как полиаденилирование 3'-конца клеточных мРНК осуществляется РНК-полимеразой II, полиаденилирование 3'-конца вирусных мРНК осуществляет вирусная полимеразы РВ1 путём многократного «сканирования» пентамера poly(U) в 16 н. о. от 5'-конца вРНК.

Описанный механизм элонгации и полиаденилирования цепи вирусной РНК объясняет, почему на 5'-конце вирусной мРНК присутствует 10–13-членный фрагмент, для которого отсутствует комплементарный участок в вРНК, а на 3'-конце — отсутствует 16-членный фрагмент.

У вируса гриппа этот процесс происходит в ядре, для большинства других сегментированных РНК-вирусов это происходит в цитоплазме.

11. Трансляция. Кэпированная лидерная кРНК положительной полярности служит матрицей для трансляции вирусного генома.

Трансляция вирусных белков на рибосомах хозяйской клетки — это процесс синтеза полипептидных цепей из аминокислот на матрице вирусной РНК с использованием клеточной тРНК, который идёт с использованием ресурсов хозяйской клетки и большими энергетическими затратами.

12. Созревание вирусных белков. Сформированные белки продвигаются к аппарату Гольджи, где происходят все модификационные изменения, и белки окончательно созревают.

Часть вновь сформированных вирусных белков, таких как РВ2, РВ1, РА, NS1, NS2, М1 и NР, необходимых для репликации генома вируса, перемещается в ядро.

Матричные РНК 7-го и 8-го сегментов вируса гриппа А подвергаются альтернативному сплайсингу, что приводит к трансляции двух различных белков: М1 или М2, а также NS1 или NS2, соответственно.

13. Транспорт вирусных белков в ядро. Вирусные белки РВ1, РВ2, РА, NР, М1, NS1 и NS2 транспортируются в ядро клетки-хозяина к месту

сборки нуклеосомы и синтеза новых сегментов генома вирусных РНК.

14. Репликация. Началом репликации генома вируса гриппа служит накопление определённых вновь синтезированных белков вируса, это белки NS1, М1, NР. Вновь синтезированные белки полимеразного комплекса возвращаются в ядро и участвуют в синтезе новой цепочки вирусной РНК, являются стартовым сигналом для репликации. Концентрация белка NР служит своего рода переключателем процессов, происходящих в ядре с транскрипции на репликацию [5, 6].

Полимеразный комплекс РВ2-РВ1-РА с 3'-5'-матрицы вирусной РНК отрицательной полярности синтезирует цепочку 5'-3' кРНК положительной полярности. Синтезированная кРНК связывается с димером белка NS1, который блокирует РНКазную активность клеточной Олигоаденилатсинтеазы/РНКазы I и останавливает процессинг клеточных белков хозяйской клетки, а также активацию различных транскрипционных факторов в клетке, обеспечивающих иммунные реакции этой клетки [6, 50].

5'-3' кРНК служит матрицей для синтеза новых вирусных РНК отрицательной полярности.

Репликация идёт без процесса кэпирования и полиаденилирования.

Созданные *de novo* вирусные РНК будут служить как сегменты генома нового вириона.

15. Формирование нуклеосомы. Следующим этапом является упаковка вРНК путём формирования нуклеосомы, в которой вирусная РНК спирализуется вокруг белка NР. Нуклеосома образована белками NР, М1 и NS2 (NEP). Когда в нуклеосоме концентрация вирусных белков М1 и NS2 (NEP) достаточно возрастает, рибонуклеопротеиновые комплексы (РНП) покидают ядро через ядерные поры и включаются в состав дочерних вирионов [6].

Взаимодействия вирусного белка NS1 с клеточными белками весьма разнообразны. Некоторые из этих взаимодействий опосредованы образованием NS1 комплексов с двцепочечными РНК (дцРНК), и структурные характеристики таких комплексов изучены достаточно подробно [50]. Однако NS1 способен напрямую комплексоваться с различными регуляторными белками клетки-хозяина — PKR (proteinkinase R — протеинкиназа R), eIF4GI (subunit gamma I of eukaryotic translation initiation factor 4 — субъединица γ 1 фактора инициации трансляции эукариот 4-го типа), PAB1 (poly(A)-binding protein type I — poly(A)-связывающий белок I-го типа) — и столь широкий спектр аффинности к неродственным белкам до сих пор не получил адекватного объяснения в научной литературе [6].

16. Транспортировка новых вРНК к месту сборки вириона. Белок М1 как многофункцио-

нальный белок играет ключевую роль в контроле транспорта РНП комплекса вируса гриппа А в клетке и в сборке вирионов к месту выпоковывания.

Белок М1 имеет сродство к холестерину би-липидных мембранах хозяйской клетки [21, 49, 51], куда он транспортируется после синтеза достаточного количества вирусных РНК. Важная роль при связывании белка М1 с липидами мембранной оболочки принадлежит электростатическим взаимодействиям между ними [51]. Таким образом М1 адсорбируется изнутри мембранной оболочки клетки и далее — путём конформационных изменений — формирует сферическую структуру, внутри которой оказывается геном вируса гриппа [6].

17. Образование новых вирионов. Создание нового вириона начинается с синтеза вирусных белков. Молекулы НА и NA синтезируются рибосомами шероховатого ретикулума и гликозилируются в его внутренней полости и доставляются к внешней клеточной мембране в транспортных везикулярных пузырьках.

Молекулы М1 и М2 синтезируются свободными цитоплазматическими рибосомами, но затем связываются с внутриклеточными мембранами и транспортируются к поверхности клетки. На поздних стадиях инфекции, на поверхностной мембране инфицированной клетки формируются «островки» вирусных антигенов — трансмембранных НА₃, NA₄ и М2₄, а также М1, импрегнирующий, то есть выстилающий изнутри, внутреннюю поверхность «островка». Формирование «островков» вирусных антигенов и последующие точки почкования дочерних вирионов происходит на апикальной (т. е. обращённых в сторону полости тела) части поляризованных клеток [5, 6, 19].

Белок М1 выполняет определяющую роль при сборке и почковании вируса за счёт своей выраженной склонности к самополимеризации и ассоциации с липидной мембраной клетки [19, 21]. М1 также является ключевым белком транспорта вновь синтезированных вРНП путём соединения М1 с вРНП своими гидрофобными участками, которые расположены непосредственно в последовательности М1 белка транспортируются в цитоплазму к мембране к месту сборки. Далее происходит перетаскивание комплексом вРНП-М1 вновь созданных вирусных рибонуклеопротеидов всех восьми сегментов.

18. Почкование дочерних вирионов. Выпoковывание новых вирионов происходит под управлением белков оболочки вируса. Этот процесс сопровождается реакцией поверхностных белков гемагглютинина с рецепторами хозяйской клетки, где ключевую роль в отсоединении нового вириона играет другой поверхностный

белок — нейраминидаза [5, 6, 31, 43]. Своей ферментативной активностью она отщепляет гликозидные остатки сиаловой кислоты, с которыми соединён гемагглютинин с рецепторами клетки, в которой шла репликация, и новый вирион, способный заражать близлежащие клетки-мишени, высвобождается в межклеточное пространство [44].

Механизмы действия этиотропных препаратов

Для лечения данного инфекционного заболевания Всемирная Организация Здравоохранения рекомендует лекарственные препараты, направленные на процесс воспроизводства вируса в клетках респираторного тракта [1, 2].

Препараты для лечения гриппозной инфекции по фармакологическому действию принято разделять на ингибиторы гемагглютинина, ингибиторы нейраминидазы, ингибиторы фазы слияния эндосомы, ингибиторы репликации вируса, а также препараты, воздействующие на стадию трансляции отдельных вирусных белков.

К ингибиторам фазы слияния (или М2-блокаторам) относятся препараты амантадин и римантадин, к ингибиторам гемагглютинина — препарат арбидол, к ингибиторам нейраминидазы — препараты осельтамивир и занамивир, к ингибиторам репликации вируса — арепли-вир, а в качестве примера препарата, воздействующего на воспроизводство отдельных вирусных белков в данной работе рассмотрен препарат ингавирин.

Вирус гриппа А имеет особенность с течением времени изменяться. Появление мутаций резистентности приводит к снижению или неэффективности противогриппозной терапии. Проблема резистентности вирусных инфекций к противовирусным препаратам является одной из наиболее актуальных [1–3, 5, 20, 27, 36, 43, 52, 53].

Выявление факторов вирулентности и их изменчивости позволяет на ранних этапах скорректировать курс лечения и использовать более действенные препараты, которые имеют наибольший эффект. Следует отметить, что мониторинг генетической изменчивости различных белков вируса гриппа позволяет отследить резистентность к тем или иным препаратам у штаммов гриппа, выявляемых в разных точках планеты.

Профилактика и лечение таких инфекционных заболеваний, как грипп является одной из приоритетных задач систем здравоохранения по всему миру, все данные по вновь появляющимся лекарственным устойчивостям штаммов гриппа отслеживаются ВОЗ, чтобы вовремя скорректировать подход к лечению данной инфекции согласно принципам доказательной медицины.

Блокаторы М2-каналов

Амантадин (МНН амантадин), римантадин (МНН римантадин) — лекарственные препараты, относящиеся к группе трициклических производных аминов. Римантадин представляет собой альфа-метил производное амантадина, который показал высокую активность *in vitro* и *in vivo* против вируса гриппа А [5]. Его действие обусловлено блокированием вирусного белка М2, который является ионным каналом оболочки вириона гриппа. Являясь слабыми основаниями, эти препараты повышают рН эндосом, окружающих вирусные частицы после их проникновения в клетку. Согласно исследованиям амантадин ингибирует часть белка М2, представляющего собой N-концевой эктодомен [54]. Предотвращение ацидификации в этих эндосомах блокирует слияние вирусной оболочки с мембраной эндосомы, останавливая изменение конформации гемагглютинина и образование поры в эндосоме с вирусной частицей, таким образом предотвращая передачу вирусного генетического материала в цитоплазму клетки [5, 6, 54].

Ранее амантадин и римантадин были включены в рекомендации ВОЗ по лечению гриппа, но в последние годы эти препараты были исключены из списка рекомендованных препаратов вследствие приобретения вирусом гриппа устойчивости к препаратам амантадина и римантадина в его классической форме [1, 2, 54, 55]. Первые доказательства резистентности были получены от устойчивых к амантадину эскейп-мутантных вирусов, у которых был картирован сайт мутации и обнаружено, что он находится в трансмембранном домене А/М2 (31).

Примером мутационной изменчивости к препаратам амантадина и римантадина могут служить замены S31 → N31 в белке М2. Ещё две мутации, приводящие к устойчивости к амантадину, происходят в остатках, которые выстилают пору. Обе эти мутации связаны с остатками, которые менее гидрофобны (A30 → T30 и G34 → E34), чем нативный остаток, что приводит к устойчивости к амантадину.

Хотя эти лекарства все ещё производятся и доступны, Центры по контролю и профилактике заболеваний и ВОЗ (CDC и WHO) больше не рекомендуют использовать адамантановые препараты для лечения или профилактики гриппа из-за появления широко распространённой резистентности [1–3].

Ингибиторы гемагглютинина

Арбидол (МНН умифеновир) относится к индол-3-производным карбоновой кислоты, разрабатывался прежде всего как препарат направленного действия для лечения и профилактики гриппа А и В. Его механизм действия направлен

на ингибирование механизма слияния эндосомы с вирусной частицей внутри клетки-мишени посредством связывания с гемагглютинином (НА) вириона гриппа [35, 56].

Молекула арбидола стабилизирует молекулу гемагглютинина, встраиваясь в пространство между тремя частями белка таким образом, что предотвращает его конформационные изменения, обеспечивающие слияния эндосомы, в которой находится вирион гриппа, и останавливает выход РНК вируса во внутреннее пространство клетки-мишени, подавляя воспроизводство вируса. В результате к эндосоме, содержащей вирусную частицу присоединяется клеточная лизосома, и образуется эндолизосома. Затем вирусная частица разрушается с помощью эндолизомальных ферментов [5, 35, 56].

В исследованиях на мышах при лечении гриппозной инфекции препаратом арбидол была выявлено, что индукция интерферонов происходит в течение 16 ч, а высокий их титр сохраняется в течение 48 ч после введения.

Преимущества арбидола заключается в том, что все изоляты вируса гриппа показали высокую чувствительность к арбидолу, и при своевременном введении он эффективно способствует выздоровлению и снижает возможные негативные последствия гриппозной инфекции. Исследования показали высокую специфичность арбидола, в том числе на штаммах, резистентных к римантадину и осельтамивиру. В клинических испытаниях на протяжении более 15 лет в сравнении с препаратами римантадина и осельтамивира выявлено, что арбидол малотоксичен и подходит для лечения детей от 3 лет, а также пациентам с сопутствующими хроническими заболеваниями [5].

В настоящий момент известные возможные мутации, которые способны вызывать резистентность вируса гриппа к препарату «Арбидол», получены только в лабораторных условиях (см. Гемагглютинин, табл. 1) [6]. На данный момент в клинических испытаниях резистентность к данному препарату не выявлена, он проявил себя как безопасный и эффективный.

Ингибиторы нейраминидазы

Тамифлю (МНН осельтамивир). Осельтамивир является пролекарством, его активный метаболит (осельтамивира карбоксилат) — эффективный и селективный ингибитор нейраминидазы вирусов гриппа А и В. Молекула осельтамивира имеет непосредственное сходство с сиалозидными рецепторами эпителиальных клеток верхних дыхательных путей [57].

Действие препарата обусловлено блокированием нейраминидазной активности вириона

гриппа путём связывания с молекулами метаболита осельтамивира с активным центром нейраминидазы, останавливая отпочковывание вирионов и распространение на другие клетки-мишени. Препарат показал высокую активность в отношении вирусов гриппа и был включён в список рекомендаций ВОЗ по лечению гриппа [1, 2].

С начала эпидемии «свиного» гриппа в 2008 г. исследования показали его неэффективность в связи с развитием резистентности циркулирующего тогда подтипа гриппа А H1N1. Изменчивость активного сайта нейраминидазы привело к тому, что осельтамивир не был способен связываться с целевыми аминокислотами активного центра этого ферментного белка. Мутации R292K, N274Y и N294S в РНК нейраминидазы привели к устойчивости вируса гриппа и его способности распространяться в эпителиальных клетках дыхательных путей независимо от приёма данного препарата [58, 59].

Препарат проявил себя как эффективный во многом за счёт его высокой биодоступности и его сродства с природными рецепторами дыхательных путей, до тех пор, пока не были выявлены случаи устойчивости вируса гриппа к его действию [3, 27, 53].

Реленза (МНН занамивир) — это ингибитор нейраминидазы, блокирующий активность всех её типов. Формула занамивира имеет сходство со строением природного субстрата для нейраминидазы — сиаловых кислот. Молекула препарата присоединяется непосредственно к активному сайту нейраминидазы и стабилизирует его конформационные изменения [48]. Таким образом блокируется возможность нейраминидазы способствовать преодолению муцинового слоя частицами вируса гриппа и выполнять основную функцию по отпочковыванию новых вирионов от заражённой клетки.

Занамивир имеет низкую биодоступность при пероральном приёме, поэтому его вводят перорально ингаляционно.

Замена в строении нейраминидазы H275Y является наиболее распространённой заменой устойчивости нейраминидазы к лекарственным препаратам и связана со снижением чувствительности к перамивиру и осельтамивиру. Эта замена не оказывает влияния на занамивир; следовательно вирусы с заменой H275Y сохраняют полную чувствительность к занамивиру [53, 60].

Ограничением в приёме занамивира может быть наличие у пациента таких заболеваний дыхательной системы, как астма или хронической обструктивной болезни лёгких в связи с его ингаляционной формой приёма [43].

Известные мутации устойчивости к занамивиру были получены только в лабораторных условиях. На данный момент среди ингибито-

ров нейраминидазы он является наиболее эффективным [48, 57, 59, 60].

Ингибиторы репликации вирусного генома

Арепливир (МНН фавипиравир) — пероральный препарат, относится к ингибиторам РНК-зависимой РНК-полимеразы вирусов, содержащих РНК в качестве генетического материала.

Препарат разрабатывался для лечения вируса гриппа А, имеет высокую эффективность против широкого спектра высокопатогенных штаммов вируса гриппа А, таких как H1N1pdm09, H5N1, H3N2 [5, 61]. Основным качеством данного препарата можно отметить то, что он интенсивно подавляет размножение вируса на стадии его репликации: непосредственно блокирует репликационный процесс путём ингибирования фермента РНК-полимеразы вируса. Формула препарата включается в синтез новой цепочки РНК, создавая мутации в РНК путём формирования в них стоп-сигналов [61].

Высокоэффективен в том числе против резистентных к осельтамивиру и римантадину штаммов гриппа.

На данный момент случаев резистентности не выявлено.

Имеются данные, что арепливир способен останавливать репликацию и других РНК-содержащих вирусов, таких как коронавирусы, буньявирусы, филовирусы (например, вирус Эбола) [62].

В процессе клинических испытаний в России, Японии, Китае и Индии данный препарат показал высокую эффективность при лечении пандемических штаммов вируса COVID-19, эффективно снижая вирусную нагрузку уже с первых часов применения. Сейчас арепливир используется по всему миру для лечения коронавирусной инфекции.

Препарат зарекомендовал себя как высокоэффективный. Возможным вариантом снижения его побочных эффектов будет пересмотр схемы его дозирования при разной степени вирусной нагрузки.

Ингибитор эндонуклеазы

Ксофлюза (МНН балоксавир марбоксил) — пероральное лекарственное средство для однократного применения, представляет собой ингибитор РНК-зависимой РНК-полимеразы, а именно эндонуклеазной активности данного фермента [24, 63, 64]. Используется для лечения пациентов с неосложнённой гриппозной инфекцией, имеющих симптомы не более 48 ч или у пациентов, контактировавших с инфицированным пациентом и подверженных высокому риску раз-

вития осложнений. PA-ингибирующая активность проявляется в выключении репликации вирусного генома. Предшественник балоксавира, поступая в желудочно-кишечный тракт, полностью гидролизруется эстеразами до его активной формы, которая избирательно блокирует фермент PA вируса гриппа, останавливая процесс экипирования вирусной мРНК, что полностью подавляет воспроизводство вируса [64].

Наиболее широко известная мутация резистентности к балоксавиру I38 → T38 белка PA. В настоящее время мутация не представлена широко в популяции штаммов вирусов гриппа и требует дальнейших исследований. В лечении немутантных по белку PA/I38T типов вируса гриппа A балоксавир зарекомендовал себя как эффективный препарат в тех случаях мутаций, которые связаны с устойчивостью к ингибиторам нейраминидазы [24–40, 42–59, 61, 63–65].

Ингибиторы воспроизводства отдельных вирусных белков

Ингавирин (МНН имидазоллилэтанамид пентандиовой кислоты) — пероральный препарат, относится к низкомолекулярным пептидам. Механизм действия заключается в стимуляции выработки эффекторного белка Mx, который подавляет стадию созревания и транспорт вирусного белка NP из цитоплазмы в ядро, что останавливает процесс сборки вирусных рибонуклеопротеидов и созревание вириона [5]. В экспериментальных исследованиях показано, что «Ингавирин» повышает экспрессию рецептора интерферона первого типа на поверхности эпителиальных и иммунокомпетентных клеток [66, 67]. Увеличение плотности интерфероновых рецепторов приводит к повышению чувствительности клеток к сигналам эндогенного интерферона. В результате подавления синтеза вирусных белков и увеличения количества интерфероновых рецепторов на поверхности заражённой клетки активируется система индукции интерферонов и запускаются механизмы клеточного и гуморального иммунитета, что выражается в увеличении содержания клеток NK-T, блокирующих заражённые клетки, и синтезу α - и γ -интерферонов. Противовоспалительное действие обусловлено подавлением продукции ключевых провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли TNF- α), интерлейкинов IL-1 β и IL- β), снижением активности миелопероксидазы.

Приём препарата Ингавирин в дозе 90 мг оказывает иммуномодулирующее действие, вызывает повышение содержания в крови интер-

феронов α и γ в пределах верхних границ физиологической нормы (8–16 ед./мл) через 24–48 ч, увеличивает и нормализует сниженную способность лейкоцитов крови продуцировать интерферон- α , а также увеличивает у практически здоровых лиц способность лейкоцитов продуцировать интерферон- γ [5, 66, 67].

В настоящий момент неизвестно о возможных мутациях, которые вызывают резистентность вируса гриппа к препарату Ингавирин.

Заключение

Эпидемиологический надзор за распространением вируса гриппа А, а также выявление его детерминант резистентности к лекарственным препаратам является одной из приоритетных задач контроля с целью повышения качества оказания медицинской помощи населению.

Современная медицинская помощь предопределяет раннюю диагностику заболевания и последующее назначение рационального и эффективного лечения, приводящее к успешному результату — улучшению состояния, выздоровлению, улучшению качества жизни и трудоспособности пациента.

Оценка предыдущего опыта применения наиболее используемых лекарственных средств на практике является необходимым условием для создания новых противовирусных препаратов и предполагает наиболее полное представление процессов, происходящих на клеточном уровне.

В данной работе рассмотрены точки приложения для совершенствования технологий проведения диагностики резистентности вируса гриппа А к широко известным и часто используемым препаратам [68]. Работа проиллюстрирована результатами молекулярных исследований по изучению жизненного цикла вируса гриппа А и его основных детерминант для применения противовирусных препаратов.

Дополнительная информация

Благодарность. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность доктору биологических наук Щелканову Михаилу Юрьевичу — директору «НИИЭМ им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, доктору биологических наук Крыловой Наталье Владимировне — заведующей лаборатории респираторных вирусных инфекций и кандидату медицинских наук Иунихиной Ольге Викторовне — заведующей лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций, за помощь и оказываемую поддержку в написании статьи.

Литература/References

1. <http://www.rospotrebnadzor.ru/news>
2. <http://www.who.int>
3. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva: Department of Communicable Disease Surveillance and Response. WHO Global Programme.
4. ICTV, 2019. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy.
5. Киселев О.И. Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. СПб.: ООО «Издательство «Росток», 2012; 272. [Kiselev O.I. Khimioterapy i khimioterapiya grippa. SPb.: OOO «Izdatel'stvo «Rostok», 2012; 272. (in Russian)]
6. Щелканов М.Ю. Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005–2009 гг.). Автореф. дисс. докт.биол. наук. М.: 2010; 53. [Shchelkanov M.Yu. Evolyutsiya vysokovirulentnogo virusa grippa A (H5N1) v ekosistemakh Severnoy Evrazii (2005–2009 gg.). Avtoreferat dissertatsii doktora biol. nauk. Moscow: 2010; 53. (in Russian)]
7. Courville C., Cadarette S.M., Wissinger E., Alvarez F. The economic burden of influenza among adults aged 18 to 64: A systematic literature review. *Influenza Other Respir Viruses*. 2022; 16 (3): 376–385. doi: 10.1111/irv.12963.
8. Авдеев С.Н. Тяжёлые формы пандемического гриппа А/Н1N1. Пульмонология и аллергология. 2010; 4: 2–10. [Avdeev S.N. Tyazhelye formy pandemicheskogo grippa A/H1N1. Pul'monologiya i Allergologiya. 2010; 4: 2–10. (in Russian)]
9. Марченко В.Ю., Святченко С.В., Онхонова Г.С., Гончарова Н.И., Рыжиков А.Б., Максотов Р.А., Гаврилова Е.В. Обзор эпизоотологической ситуации по высокопатогенному гриппу птиц в России и мире в 2022 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2023; 1: 48–55. doi: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-48-55>. [Marchenko V.Yu., Svyatchenko S.V., Onkhonova G.S., Goncharova N.I., Ryzhikov A.B., Maksytov R.A., Gavrilova E.V. Obzor epizootologicheskoy situatsii po vysokopatogennomu grippu ptits v Rossii i mire v 2022 g. Problemy osobo opasnykh infektsij. 2023; 1: 48–55. doi: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-48-55>. (in Russian)]
10. Sharp G.B., Kawaoka Y., Jones Dana J., Bean W.J., Pryor Paul S., Hinshaw V., Webster Robert G. Coinfection of wild ducks by Influenza A Virus: Distribution Patterns and Biological Significance. *J Virol*. 1997; 71 (8): 1628–6135. doi: 10.1128/JVI.71.8.1628-6135.1997.
11. Shortridge K.F. Pandemic influenza: a zoonosis? *Semin Respir Infect*. 1992; 7: 11–25.
12. Webster R.G., Ramires K.M. et al. Changing epidemiology and ecology of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. *Avian Dis*. 2007; 51: 269–272. doi: 10.1637/7641-050206R.1.
13. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. 1992; 56: 152–79. doi: 10.1128/mr.56.1.152-179.1992.
14. Wright P.F., Webster R.G. Orthomyxoviruses. *Fields virology*. In: D.M. Knipe, P.M. Howley (eds.) Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001; 1533–1579.
15. Falchi A., Amoros J.P., Arena C., Arrighi J. et al. Genetic structure of human A/H1N1 and A/H3N2 influenza virus on Corsica Island: phylogenetic analysis and vaccine strain match, 2006–2010. *PLoS One*. 2011; 6 (9): e24471. doi: 10.1371/journal.pone.0024471.
16. Авдеев С.Н. (2009) Тяжёлые формы пандемического гриппа А/Н1N1, Пульмонология и аллергология, №4, 2010, С. 2 – 10.
17. Дунаева М.Н., Щелканов М.Ю. Эколого-вирусологический мониторинг вируса гриппа А в природных экосистемах. Инновации и технологии в биомедицине: Научно-практическая конференция ДВФУ, Владивосток. 2020; 183–186. ISBN 978-5-7444-49-19-3.
18. Böttcher-Friebertshäuser E., Garten W., Matrosovich M., Klenk H.D. The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014; 385: 3–34. doi: 10.1007/82_2014_384.
19. Colman P.M., Varghese J.N., Baker A.T., Tulloch P.A., Laver W.G., Air G.M. Webster R.G. The structure of a complex between influenza virus neuraminidase and an antibody. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography*. 1987; 43: 34–35. doi: <https://doi.org/10.1107/S0108767387084538>.
20. Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Щелканов М.Ю. и др. Пандемический грипп в России: отличительные особенности клинического течения и отсутствие ранней этиотропной терапии как фактор риска развития тяжёлых форм заболевания. *Терапевтический архив*. 2011; 83 (9): 48–53. [Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Shchelkanov M.Yu. i dr. Pandemicheskij gripp v Rossii: otlichitel'nye osobennosti klinicheskogo techeniya i otsutstvie rannej etiotropnoj terapii kak faktor riska razvitiya tyazhelykh form zabolevaniya, Terapevticheskij Arkhiv. 2011; 83 (9): 48–53. (in Russian)]
21. Жирнов О.П. Асимметричная структура вируса гриппа А и новая функция матричного белка М1. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4). doi: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-149-154>. Zhirnov O.P. Asimmetrichnaya struktura virusa grippa A i novaya funktsiya matriksnogo belka M1. *Voprosy Virusologii*. 2016; 61 (4). doi: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-149-154>. (in Russian)]
22. Ломакина Н.Ф., Садыкова Г.К., Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Боравлева Е.Ю., Иванов П.А., Прилипов А.Г., Гамбарян А.С. Три мутации в стеблевом гемагглютинина участке влияют на рН слияния и патогенность вируса гриппа H5N1. *Молекулярная биология*, 2018; 52 (6): 1029–1037. [Lomakina N.F., Sadykova G.K., Timofeeva T.A., Rudneva I.A., Boravleva E.Yu., Ivanov P.A., Prilipov A.G., Gambaryan A.S. Tri mutatsii v stebel'vom gemaggljyutinina uchastke vliyayut na rN sliyaniya i patogenost' virusa grippa H5N1. *Molekulyarnaya Biologiya*, 2018; 52 (6): 1029–1037. (in Russian)]
23. Meisner J., Szretter K.J., Bradley K.C. et al. Infectivity studies of influenza virus hemagglutinin receptor binding site mutants in mice. *J Virol*. 2008; 82 (10): 5079–83. doi: 10.1128/JVI.01958-07.
24. Omoto S., Speranzini V., Hashimoto T. et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 9633. doi: 10.1038/s41598-018-27890-4.
25. Popov A.E., Shchelkanov M.Yu., Dmitrenko K.A., Simakova A.I. Combined therapy of influenza with antiviral drugs with a different mechanism of action in comparison with monotherapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018; 10 (2): 357–360.
26. Дунаева М.Н., Щелканов М.Ю. Эколого-вирусологический мониторинг вируса гриппа А в природных экосистемах. Инновации и технологии в биомедицине: Научно-практическая конференция ДВФУ, Владивосток. 2010; 183–186. ISBN 978-5-7444-49-19-3. [Dunaeva M.N., Shchelkanov M.Yu. Ekologo-virusologicheskij monitoring virusa grippa A v prirodnykh ekosistemakh. Innovatsii i tekhnologii v biomeditsine: Nauchno-prakticheskaya konferentsiya DVFU, Vladivostok. 2010; 183–186. ISBN 978-5-7444-49-19-3. (in Russian)]
27. Яцышина С.Б., Шестопалов А.М., Евсеев В.А. и др. Изоляция и молекулярная характеристика вирусов гриппа А/Н5N1, выделенных во время вспышек гриппа у птиц в 2005 г. в европейской части России: выделение штамма вируса с мутацией устойчивости к озельтамивиру. *Молекулярно-генетическая микробиология и вирусология*. 2008; 1: 26–34. [Yatsyshina S.B., Shestopalov A.M., Evseenko V.A. i dr. Izolyatsiya i molekulyarnaya kharakteristika virusov grippa A/H5N1, vydelennykh vo vremya vspyshek grippa u ptits v 2005 g. v evropejskoj chasti Rossii: vydelenie shtamma virusa s mutatsiej ustojchivosti k ozeltamiviru. *Molekulyarno-Geneticheskaya Mikrobiologiya i Virusologiya*. 2008; 1: 26–34. (in Russian)]
28. Тимофеева Т.А. et al. Mutations in the genome of avian influenza viruses of the H1 and H5 subtypes responsible for adaptation to mammals. *Microbiology Independent Research Journal*. 2021; 8 (1): 50–61. doi: <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2021-8-1-50-61>.
29. Dias A., Bowie D., Crepin T. et al. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*. 2009; 458: 914–918. doi: 10.1038/nature07745.
30. Chen J., Lee K.H., Steinhauer D.A., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of Influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*. 1998; 95 (3): 409–417. doi: 10.1016/s0092-8674 (00)81771-7.
31. Соболев И.А. Изменчивость поверхностных гликопротеинов вирусов гриппа А (H3N2) и В, циркулировавших на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. автореф. дисс. канд.биол. наук. СПб.: 2017; 28. [Sobolev I.A. Izmenchivost' poverkhnostnykh glykoproteinov virusov grippa A (N3N2) i V, tsirkulirovavshikh na territorii aziatskoj chasti RF s 2008 po 2013 gg. avtoreferat dissertatsii kandidata biol. nauk. Spb.: 2017; 28. (in Russian)]
32. Meisner J., et al. (2008) 'Infectivity studies of influenza virus hemagglutinin receptor binding site mutants in mice', *Journal of Virology*, 82 (10): 5079-83. doi: 10.1128/JVI.01958-07
33. Гамбарян А., Маринина В.П., Солодар Т.А. и др. Различная рецепторная специфичность вирусов гриппа от уток и кур и её отражение в составе сиализидов на хозяйских клетках и муцинах. *Вопросы вирусологии*. 2006; 4: 24–32. [Gambaryan A., Marinina V.P., Solodar T.A. i dr. Razlichnaya retseptornaya spetsifichnost' virusov grippa ot utok i kur i ee otrazhenie v sostave sialozidov na khozyajskikh kletkakh i mutsinah. *Voprosy Virusologii*. 2006; 4: 24–32. (in Russian)]
34. Jiao C., Wang B., Chen P., Jiang Y. and Liu J. Analysis of the conserved protective epitopes of hemagglutinin on influenza A viruses. *Front Immunol*. 2023; 14: 1086297. doi: 10.3389/fimmu.2023.1086297.

35. *Kadam R.U., Wilson I.* Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2016; 114 (2): 206–214. doi: 10.1073/pnas.1617020114.
36. *Львов Д.К., Щелканов М.Ю. и др.* Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, изолированных в 2009–2011 гг., структурой рецепторсвязывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. *Вопросы вирусологии.* 2012; 57 (1): 14–17. [*L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu. et al.* Korrelyatsiya mezhdu retseptornoj spetsifichnost' jyu shtammov pandemicheskogo virusa grippa A (H1N1) pdm09, izolirovannykh v 2009–2011 gg., strukturoj retseptorsvyazyvayushchego sajta i veroyatnost' jyu razvitiya letal'noj pervichnoj virusnoj pnevmonii. *Voprosy Virusologii.* 2012; 57 (1): 14–17. (in Russian)]
37. *Chen J., Lee K.H., Steinhauer D.A., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C.* Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of Influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell.* 1998; 95 (3): 409–417. doi: 10.1016/s0092-8674 (00)81771-7.
38. *Webster R.G., Ramires K.M. et al.* Changing epidemiology and ecology of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. *Avian Dis.* 2007; 51: 269–272. doi: 10.1637/7641-050206R.1.
39. *Андрюсов А.В., Пчелкина И.П., Чвала И.А., Дрыгин В.В.* Изучение первичной структуры генома изолятов вируса высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N1, выделенных на территории России в 2007 году. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных. XII.* [*Andriyasov A.V., Pchelkina I.P., Chvala I.A., Drygin V.V.* Izuchenie pervichnoj struktury genoma izolotov virusa vysokopatogennogo grippa ptits A/H5N1, vydelennykh na territorii Rossii v 2007 godu. *Trudy Federal'nogo tsentra okhrany zdorov'ya zhivotnykh. XII.* (in Russian)]
40. *Gao J., Gui M., Xiang Y.* Structural intermediates in the low pH-induced transition of influenza hemagglutinin. *PLoS Pathog.* 2020; 16 (11): e1009062. doi: 10.1371/journal.ppat.1009062.
41. *Дунаева М.Н., Иунихина О.В., Суrowый А.Л., Панкратов Д.В., Щелканов М.Ю.* Эколого-вирусологический мониторинг вируса гриппа А на территории Приморского края в 2019–2023 гг. *Дальневосточный Журнал инфекционной патологии.* 2023; 45: 120–121. [*Dunaeva M.N., Iunikhina O.V., Surovyy A.L., Pankratov D.V., Shchelkanov M.Yu.* Ekologo-virusologicheskij monitoring virusa grippa A na territorii Primorskogo kraja v 2019–2023 gg. *Dal'nevostochnyj Zhurnal Infektsionnoj Patologii.* 2023; 45: 120–121. (in Russian)]
42. *Alexander D.J.* A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol.* 2000; 74 (1–2): 3–13. doi: 10.1016/s0378-1135 (00)00160-7.
43. *Щелканов М.Ю., Попов А.Ф., Симакова А.И., Зенин И.В., Прошина Е.С., Кириллов И.М., Дмитриенко К.А., Шевчук Д.В.* Патогенез гриппа: механизмы модуляции белками возбудителя. *Журнал инфектологии.* 2015; 7 (2). doi: doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-2-31-46. [*Shchelkanov M.Yu., Popov A.F., Simakova A.I., Zenin I.V., Proshina E.S., Kirillov I.M., Dmitrienko K.A., Shevchuk D.V.* Patogenez grippa: mekhanizmy modulyatsii belkami vozбудitelya. *Zhurnal Infektologii.* 2015; 7 (2). doi: doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-2-31-46. (in Russian)]
44. *Barman S., Adhikary L., Chakrabarti A.K., Bernas C., Kawaoka Y., Nayak D.P.* Role of Transmembrane domain and cytoplasmic tail amino acid sequences of influenza A virus neuraminidase in raft association and virus budding. *J Virol.* 2004; 78 (10): 5258–5269. doi: 10.1128/JVI.78.10.5258-5269.2004.
45. *Colman P.M., Varghese J.N., Baker A.T., Tulloch P.A., Laver W.G., Air G.M., Webster R.G.* The structure of a complex between influenza virus neuraminidase and an antibody. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography.* 1987; 43: 34–35. doi: https://doi.org/10.1107/S0108767387084538.
46. *Creytens S., Pascha M.N., Ballegeer M., Saelens X., de Haan C.* Influenza neuraminidase characteristics and potential as a vaccine target. *Front Immunol.* 2021; 12: 786617. doi: 10.3389/fimmu.2021.786617.
47. *Белякова Н.В.* Нейраминидазная специфичность штаммов вирусов гриппа А и В, циркулировавших в России в эпидсезоны 2006–2010 гг.: автореф. дисс. канд.биол. наук. М.: 2010; 28. [*Belyakova N.V.* Nejraminidaznaya spetsifichnost' shtammov virusov grippa A i V, tsirkulirovavshikh v Rossii v epidezozny 2006–2010 gg. *Avtoreferat dissertatsii kandidata biol. nauk.* Moscow: 2010; 28. (in Russian)]
48. *Vavricka C.J., Liu Y. et al.* Influenza neuraminidase operates via a nucleophilic mechanism and can be targeted by covalent inhibitors. *Nat Commun.* 2013; 4: 1491. doi: 10.1038/ncomms2487.
49. *Jun Zhang, Xiao Ling Yu, Lei Xu, Fang Zhi Li, Yong Gang Li.* Sequence Characterization of matrix protein (M1) in influenza A viruses (H1, H3 and H5). *Microbiology Research.* 2011; 2: e16. doi: https://doi.org/10.4081/mr.2011.e16.
50. *Qian X.Y., Chien C.Y., Lu Y.* An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. *RNA.* 1995; 1 (9): 948–956.
51. *Ксенофонтов А.Л., Добров Е.Н., Федорова Н.В., Радюхин В.А., Бадун Г.А., Арутюнян А.М., Богачева Е.Н., Баратова Л.А.* Неупорядоченные области в структуре С домена белка М1 вируса гриппа. *Молекулярная биология.* 2011; 45 (4): 689–696. [*Ksenofontov A.L., Dobrov E.N., Fedorova N.V., Radjyukhin V.A., Badun G.A., Arutyunyan A.M., Bogacheva E.N., Baratova L.A.* Neuporyadochennye oblasti v strukture C domena belka M1 virusa grippa. *Molekulyarnaya Biologiya.* 2011; 45 (4): 689–696. (in Russian)]
52. *Popov A.F., Shchelkanov M.Yu., Dmitrenko K.A., Simakova A.I.* Combined therapy of influenza with antiviral drugs with a different mechanism of action in comparison with monotherapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2018; 10 (2): 357–360.
53. *Moscona A.* Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med.* 2009; 360: 953–956. doi: 10.1056/NEJMp0900648.
54. *Deyde V.M., Xu X., Bright R.A. et al.* Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis.* 2007; 15; 196 (2): 249–57. doi: 10.1086/518936.
55. *Nelson M. I., Simonsen L., Viboud C., Miller M. A., Holmes E. C.* The origin and global emergence of adamantane resistant A/H3N2 influenza viruses. *Virology.* 2009; 388: 270–278. doi: 10.1016/j.virol.2009.03.026.
56. *Bai X., Xi S., Chen G., Fan X., Wang K., Li Y., Zhao Y., Wang W. and Tian Y.* Multicenter, randomized controlled, open label evaluation of the efficacy and safety of arbidol hydrochloride tablets in the treatment of influenza-like cases. *BMC Infect Dis.* 2013; 6 (23): 585. doi: 10.1186/s12879-023-08570-9.
57. *Mawatari M., Saito R., Hibino A., Kondo H., Yagami R., Odagiri T., Tanabe I., Shobugawa Y.* Effectiveness of four types of neuraminidase inhibitors applied in Japan for the treatment of influenza. *PLoS One.* 2019; 14 (11): e0224683. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0224683.
58. *Storms A.D., Gubareva L.V., Su S. et al.* Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 Virus Infections, United States, 2010–2011. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18 (2): 308–311. doi: 10.3201/eid1802.111466.
59. *Lackenby, A. et al.* (2018) 'Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017', *Antiviral Research.* 2018; 157: 38–46. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.07.001.
60. *Duval X., Werf S., Blanchon T., Mosnier A., Bouscambert-Duchamp M., Tibi A., Enouf V., Andreoletti L., Tubach F., Lina B., Mentre F., Lepout C.* Efficacy of Oseltamivir-Zanamivir Combination Compared to Each Monotherapy for Seasonal Influenza: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *PLoS Med.* 2010; 7 (11): e1000362. doi: 10.1371/journal.pmed.1000362.
61. *Kiso M., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y. et al.* T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc Nat Acad Sciences.* 2010; 107: 882–887. doi: 10.1073/pnas.0909603107.
62. *Mendenhall M., Russell A., Juelich T. et al.* Favipiravir Inhibition of Arenavirus Replication in Cell Culture', *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 782–787. doi: 10.1128/AAC.01219-10.
63. *Mullard A.* FDA approves first new flu drug in 20 years. *Nat Rev Drug Discov.* 2018; 17 (853). doi: 10.1038/nrd.2018.219.
64. *Hayden F.G. et al.* (2018) 'Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J Med.* 2018; 379: 913–923. doi: 10.1056/NEJMoa1716197.
65. *Timofeeva T.A. et al.* Mutations in the genome of avian influenza viruses of the H1 and H5 subtypes responsible for adaptation to mammals. *Microbiology Independent Research Journal.* 2021; 8 (1): 50–61. doi: https://doi.org/10.18527/2500-2236-2021-8-1-50-61.
66. *Логонова С.Я., Борисевич С.В., Шкляева О.М., Максимов В.А., Бондарев В.П., Небольсин В.Е.* Изучение профилактической и терапевтической эффективности нового отечественного химиопрепарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H5N1). *Антибиотики и химиотер.* 2010; 55 (7–8): 10. [*Loginova S.Ya., Borisevich S.V., Shklyayeva O.M., Maksimov V.A., Bondarev V.P., Nebol'sin V.E.* Izuchenie profilakticheskoy i terapevticheskoy effektivnosti novogo otechestvennogo khimioterapata Ingavirin® v otnoshenii vozбудitelya grippa A (H5N1). *Antibiotiki i Khimioter.* 2010; 55 (7–8): 10. (in Russian)]
67. *Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Щелканов М.Ю., Бурицева Е.И., Исаева Е.И., Малышев Н.А., Львов Д.К.* Эффективность ингавирина в лечении гриппа у взрослых. *Терапевтический архив.* 2009; 89 (3): 51–53. [*Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Shchelkanov M.Yu., Burtseva E.I., Isaeva E.I., Malyshev N.A., L'vov D.K.* Effektivnost' ingavirina v lechenii grippa u vzroslykh. *Terapevticheskij Arkhiv.* 2009; 89 (3): 51–53. (in Russian)]
68. *Дунаева М.Н., Щелканов М.Ю., Панкратов Д.В., Иунихина О.В., Крылова Н.В., Лубова В.А.* Заявка на патент «Набор олигонуклео-

тидов-праймеров, используемых для идентификации вируса гриппа А». регистрационный номер 2023127156. 2023 г. [Dunaeva M.N., Shchelkanov M.Jyu., Pankratov D.V., Iunikhina O.V., Krylova N.V., Lubova V.A. Zayavka na patent «Nabor oligonukleotidov-prajmerov, ispol'zuemykh

dlya identifikatsii virusa grippa A». registratsionnyj nomer 2023127156. 2023. (in Russian)]

Поступила / Received 08.04.2024
Принята в печать / Accepted 20.04.2024

Информация об авторе

Дунаева Мария Николаевна — младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора; преподаватель Школы биомедицины, ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет». ORCID ID: 0000-0002-1728-1852

About the author

Maria N. Dunaeva — Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal Viral Infections, Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G. P. Somov of Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare; Lecturer at the School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia. ORCID ID: 0000-0002-1728-1852

Иммуногенность, эффективность и безопасность трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины у больных воспалительными заболеваниями суставов, получающих современную противоревматическую терапию

*М. М. БАРАНОВА¹, Н. В. МУРАВЬЕВА¹, Б. С. БЕЛОВ¹,
М. Е. ДИАТРОПТОВ¹, Д. В. БУХАНОВА²

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия

² АО Р-ФАРМ, Москва, Россия

Резюме

Имеющиеся в настоящее время данные крупных когортных исследований свидетельствуют о значимом нарастании заболеваемости гриппом среди больных иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями (ИВРЗ) по сравнению с популяцией, что обуславливает важность проведения профилактических мероприятий, в том числе вакцинации, у этих пациентов. Однако данные по иммуногенности, эффективности и безопасности гриппозных вакцин у больных ревматоидным артритом (РА), анкилозирующим спондилитом (АС) и псориатическим артритом (ПсА), получающих современную противоревматическую терапию, ограничены. Цель исследования — изучить иммуногенность, эффективность и безопасность трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины у больных воспалительными заболеваниями суставов (ВЗС): РА, АС и ПсА, наблюдавшихся в ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой. *Материал и методы.* В открытое проспективное сравнительное исследование было включено 74 пациента с РА, 62 — АС, 14 — ПсА (из них женщин — 86, мужчин — 64) и 97 человек контрольной группы (КГ) без ИВРЗ. Набор пациентов осуществляли на протяжении шести эпидемических сезонов: 2016–2017, 2017–2018, 2018–2019, 2020–2021, 2021–2022, 2022–2023 гг. Большинство пациентов (78,7%) на момент включения в исследование получали иммуносупрессивную терапию. Трёхвалентную инактивированную гриппозную сплит-вакцину вводили в количестве 1 дозы (0,5 мл) внутримышечно на фоне проводимой противоревматической терапии независимо от активности основного ИВРЗ. Уровень антител (АТ) класса G к гемагглютнину (ГА) вирусов гриппа А (H1N1), А (H3N2) и В определяли в единицах оптической плотности (ед. ОП) с помощью иммуноферментных тест-систем (ООО «ППДП» г. Санкт-Петербург) исходно, через 1–3 мес. после вакцинации и через 6 мес. после вакцинации. Также оценивали клиническую эффективность и безопасность трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины, в т. ч. влияние на течение РА, АС и ПсА по динамике индексов активности заболеваний. *Результаты.* После вакцинации отмечено значимое повышение уровня АТ у больных РА, АС и ПсА. К визиту III (6 мес. после вакцинации) отмечалось некоторое снижение иммунного ответа, однако уровень АТ оставался достоверно выше исходного для всех штаммов вируса гриппа, за исключением гриппа В в группе больных РА. За время наблюдения эпизоды гриппа или гриппоподобного заболевания (ГПЗ) отсутствовали у 98,6% пациентов, завершивших исследование. Негативного влияния вакцинации на активность основного ИВРЗ не отмечено. Частота поствакцинальных реакций (ПВР) у больных и в КГ была сопоставима. *Выводы.* Полученные результаты исследования свидетельствуют о достаточной иммуногенности, клинической эффективности и безопасности трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины у больных РА, АС и ПсА.

Ключевые слова: грипп; ревматоидный артрит; анкилозирующий спондилит; псориатический артрит; вакцинация; эффективность; иммуногенность; безопасность

Для цитирования: Баранова М. М., Муравьева Н. В., Белов Б. С., Диатроптов М. Е., Буханова Д. В. Иммуногенность, эффективность и безопасность трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины у больных воспалительными заболеваниями суставов, получающих современную противоревматическую терапию. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (3–4): 95–101. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-95-101>. EDN: MDMDTR.

Immunogenicity, Effectiveness, and Safety of Trivalent Inactivated Influenza Split Vaccine in Patients with Inflammatory Joint Diseases Receiving Modern Antirheumatic Therapy

*MARINA M. BARANOVA¹, NATALIA V. MURAVYEVA¹, BORIS S. BELOV¹,
MIKHAIL E. DIATROPTOV¹, DARIA V. BUKHANOVA²

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: baranovamarina103@gmail.com



*Correspondence to:
E-mail: baranovamarina103@gmail.com



EDN: MDMDTR

Abstract

According to the currently available data from large cohort studies, patients with immuno-inflammatory rheumatic diseases (IIRDs) are at increased risk of infectious complications, including influenza, compared to the general population. Vaccinations are a critical component of their care. However, data on the immunogenicity, efficacy, and safety of influenza vaccines in patients with rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS), and psoriatic arthritis (PsA) receiving modern anti-rheumatic drugs are limited. *The aim of the study* was to investigate the immunogenicity, efficacy, and safety of the trivalent inactivated influenza split vaccine in patients with RA, AS and PsA, observed at the V. A. Nasonova Research Institute. *Materials and methods.* The open prospective comparative study included 247 patients: 74 patients with RA, 62 patients with AS, 14 patients with PsA, as well as 97 people without IIRDs who comprised the control group (CG). The patients were selected over six epidemic seasons: 2016–2017, 2017–2018, 2018–2019, 2020–2021, 2021–2022, and 2022–2023. The majority of patients (78,7%) received immunosuppressive therapy at the time of inclusion in the study. The trivalent inactivated influenza split vaccine was administered in an amount of 1 dose (0,5 ml) intramuscularly against the background of anti-rheumatic therapy, regardless of the activity of the main IIRD. The level of class G antibodies to hemagglutinin (HA) of influenza A (H1N1), A (H3N2), and B viruses was determined in optical density units (OD units) using an enzyme-linked immunosorbent assay (PPDP LLC, St. Petersburg) before vaccination, 1–3 and 6 months after vaccination. The clinical efficacy and safety of the trivalent inactivated influenza split vaccine were also evaluated, including the effect on the course of RA, AS, and PsA according to the dynamics of disease activity indices. *Results.* After vaccination, a significant increase in the level of antibodies was observed in patients with RA, AS, and PsA. At the second visit after vaccination the level of antibodies, determined in units of optical density, to HA of influenza A (H1N1), A (H3N2) and B was significantly higher compared to baseline values. By the third visit (6 months after vaccination), there was a slight decrease in the immune response, but the level of antibodies remained significantly higher than the initial level for all strains of influenza virus, with the exception of influenza B in the group of patients with RA. During follow-up, influenza or influenza-like illness was absent in 98,6% of patients who completed the study. No negative effect of vaccination on the activity of the underlying IIRD was noted. The frequency of post-vaccination reactions in patients with IIRDs and in the CG was comparable. *Conclusions.* The results obtained in the study indicate sufficient immunogenicity, clinical efficacy, and safety of the trivalent inactivated influenza split vaccine in patients with RA, AS, and PsA.

Keywords: influenza; rheumatoid arthritis; ankylosing spondylitis; psoriatic arthritis; vaccination; efficacy; immunogenicity; safety

For citation: Baranova M. M., Muravyeva N. V., Belov B. S., Diatroptov M. E., Bukhanova D. V. Immunogenicity, effectiveness, and safety of trivalent inactivated influenza split vaccine in patients with inflammatory joint diseases receiving modern anti-rheumatic therapy. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (3–4): 95–101. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-3-4-95-101>. EDN: MDMDTR.

Введение

Хорошо известно, что пациенты с ИВРЗ подвержены развитию инфекций разнообразной природы и локализации, а также ассоциированных с ними осложнений. Грипп не является исключением. В частности, в ретроспективном исследовании W. A. Blumentals и соавт. [1] заболеваемость гриппом среди больных РА превышала таковую в популяции в 1,57 раз и составила 409,3 случая против 306,1 на 100 000 пациенто-лет. В другом исследовании, частота ГПЗ в рамках одного эпидемического сезона среди пациентов с ВЗС ($n=159$), получающих терапию генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП), составила 17% против 9,7% в широкой выборке итальянской популяции [2]. В более позднем исследовании с включением сходной когорты пациентов риск летального исхода при гриппе был в 2,63 раза выше аналогичного популяционного показателя [3]. Сезонная вакцинация является наиболее эффективным методом профилактики гриппа [4], в том числе у больных ИВРЗ [5, 6]. Однако постоянно обновляющиеся схемы лечения ИВРЗ, а также разработка и внедрение новых, в том числе высокодозных вакцин, требуют постоянной актуализации данных по иммуногенности, эффективности и без-

опасности гриппозных вакцин у больных ИВРЗ, в том числе ВЗС. Изучению вышеизложенных вопросов было посвящено настоящее исследование.

Цель исследования — изучить иммуногенность, эффективность, и безопасность трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины у больных ВЗС — РА, АС и ПсА, наблюдавшихся в ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой.

Материал и методы

Набор пациентов осуществляли на протяжении шести эпидемических сезонов: 2016–2017, 2017–2018, 2018–2019, 2020–2021, 2021–2022, 2022–2023 гг. В исследование было включено 150 пациентов (86 женщин, 64 мужчины, средний возраст $47,9 \pm 10,8$ лет) с ВЗС, в т. ч. РА — 74, АС — 62, ПсА — 14, а также 97 человек без ИВРЗ (контрольная группа).

Среди пациентов с РА преобладали женщины (93%), средний возраст — $57,2 \pm 11,5$ лет, средняя продолжительность заболевания — $5,3 \pm 5,1$ лет, среднее значение индекса активности DAS28 (Disease Activity Score 28, индекс активности РА) на момент включения в исследование составляло $3,7 \pm 1,5$. 36 пациентов с РА в качестве базисного противовоспалительного препарата (БПВП) получали метотрексат (МТ), 11 — лефлуномид (ЛЕФ), 1 — сульфасалазин (СУЛЬФ). Два пациента получали комбинированную терапию низкими дозами глюкокортикостероидов (ГК) и МТ/СУЛЬФ, один — комбинированную терапию МТ и гидроксихлорохином, один — монотерапию низкими дозами ГК, один больной находился в безмедика-

ментозной ремиссии. Среди ГИБП наиболее часто применялись препараты из группы ингибиторов фактора некроза опухоли α (иФНО- α) в комбинации с МТ. Так, адалимумаб получали 6 пациентов, этанерцепт — 2 и голимумаб — 2. Абацацепт получали 5 пациентов, двое из них — в комбинации с МТ, один — в комбинации с ЛЕФ. Шесть пациентов получали ритуксимаб за 2,5–14 мес. до вакцинации.

В группе больных спондилоартритами (СпА), включавшей пациентов с АС и ПсА, преобладали мужчины (67,1%). Больные СпА были моложе по сравнению с пациентами с РА, средний возраст составил $38,6 \pm 10,0$ лет ($p=0,003$). Средняя продолжительность заболевания у больных АС и ПсА составила $13,4 \pm 9,7$ лет. Для оценки активности ИВРЗ у больных АС использовали индекс BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, Батский индекс активности АС), среднее значение которого на момент вакцинации от гриппа было $3,6 \pm 2,1$. У больных ПсА рассчитывали индекс DAPSA (Disease Activity Index for Psoriatic Arthritis, индекс активности ПсА), среднее значение которого исходно составило $13,7 \pm 8,6$. У пациентов с ПсА дополнительно оценивали площадь поражения кожи псориазом — BSA (Body Surface Area, площадь поверхности тела, %), при распространённом псориазе ($BSA \geq 3\%$) рассчитывался индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index, индекс распространённости и тяжести псориаза). Распространённый псориаз на момент включения в исследование имелся у трёх больных ПсА, значения индекса PASI составили 3,3, 11,0 и 26,6. Терапия у больных АС и ПсА, проводимая на момент вакцинации от гриппа, отражена в таблице.

Как видно из таблицы, большинство пациентов с АС и ПсА (60,5%) на момент включения в исследование получали иммуносупрессивную терапию — ГИБП, МТ/ЛЕФ, а также комбинированную терапию ГИБП±МТ/ЛЕФ. Среди ГИБП наиболее часто применялись иФНО- α (71,1%), среди БПВП — МТ (61,1%).

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой. У всех участников исследования было получено информированное согласие.

В исследование не включали больных с непереносимостью компонентов вакцин в анамнезе, симптоматикой выраженной печёночной и/или почечной недостаточности, вакцинированных от гриппа в текущем эпидемическом сезоне, с наличием текущего инфекционного заболевания, а также беременных и кормящих грудью женщин.

Терапия, проводимая на визите I у больных АС и ПсА, привитых трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакциной

Therapy carried out during the first visit in patients with AS and PsA vaccinated with trivalent inactivated influenza split vaccine

Терапия на момент вакцинации	АС и ПсА (в общем), $n=76$
ГИБП, n (%)	38 (50,3)
иФНО- α , n (%)	22 (29,0)
иИЛ17, n (%)	5 (6,6)
иФНО- α +МТ, n (%)	3 (4,0)
иФНО- α +СУЛЬФ, n (%)	2 (2,6)
иИЛ17+МТ, n (%)	4 (5,3)
иИЛ17+ЛЕФ, n (%)	1 (1,3)
иИЛ17+СУЛЬФ, n (%)	1 (1,3)
Тофацитиниб, n (%)	1 (1,3)
МТ, n (%)	4 (5,3)
ЛЕФ, n (%)	3 (4,0)
СУЛЬФ, n (%)	8 (10,5)
Монотерапия НПВП, n (%)	22 (29,0)

Примечание. иИЛ-17 — ингибиторы интерлейкина 17; НПВП — нестероидные противовоспалительные препараты.

Note. иИЛ-17 — interleukin 17 inhibitors; НПВП — non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Вакцинацию проводили на фоне продолжающейся противоревматической терапии вне зависимости от активности основного заболевания. Трёхвалентную инактивированную гриппозную сплит-вакцину вводили в количестве 1 дозы (0,5 мл) в дельтовидную мышцу. Период наблюдения пациентов составлял 6 мес. ежегодно от момента вакцинации и включал 3 визита: исходный, через 1–3 мес. после вакцинации, через 6 мес. после вакцинации. Каждый визит включал сбор анамнеза, физикальное обследование, оценку активности ИВРЗ с использованием общепринятых индексов, а также лабораторные методы исследования (клинический анализ крови+скорость оседания эритроцитов, определение высокочувствительного С-реактивного белка, антинуклеарного фактора на клетках HEp-2, а также уровня АТ класса G к ГА вирусом гриппа А (H1N1), А (H3N2) и В с помощью иммуноферментных тест-систем, производства ООО «ППДП» г. Санкт-Петербург. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Иммуногенность и клиническая эффективность. После вакцинации отмечено значимое повышение уровня АТ (ед. ОП) к ГА вирусом гриппа А (H1N1), А (H3N2) и В (рис. 1–6) как у больных РА, так и СпА. Пиковый иммунный ответ по всем трём штаммам, входящим в состав используемых гриппозных вакцин, среди больных РА, АС и ПсА зафиксирован на визите II. К визиту III (6 мес. после вакцинации) отмечалось некоторое снижение иммунного ответа, однако уровень АТ оставался достоверно выше исходного для всех штаммов вируса гриппа, за исключением гриппа В в группе больных РА.

При анализе влияния клиничко-демографических характеристик (возраст, активность ВЗС на исходном визите), а также проводимой иммуносупрессивной терапии на иммуногенность трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-

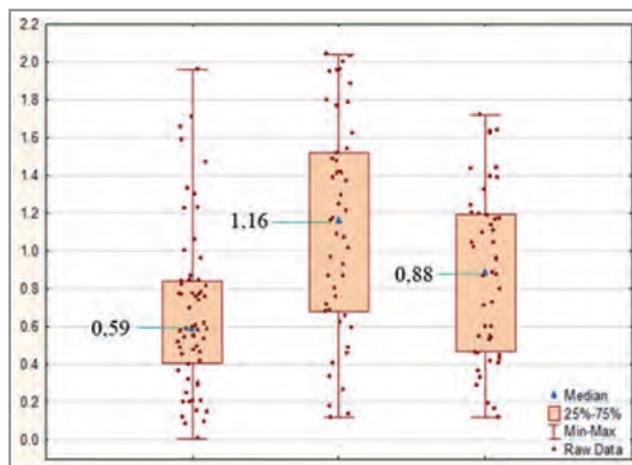


Рис. 1. Динамика уровня АТ к ГА гриппа А (H1N1) у больных РА на протяжении периода наблюдения, ед. ОП

Примечание. $p_{I-II, I-III}=0,0001$.

Рис. 1. Dynamics of the level of antibodies to influenza A (H1N1) hemagglutinin in patients with RA during the observation period, optical density units.

Note. $P_{I-II, I-III}=0,0001$.

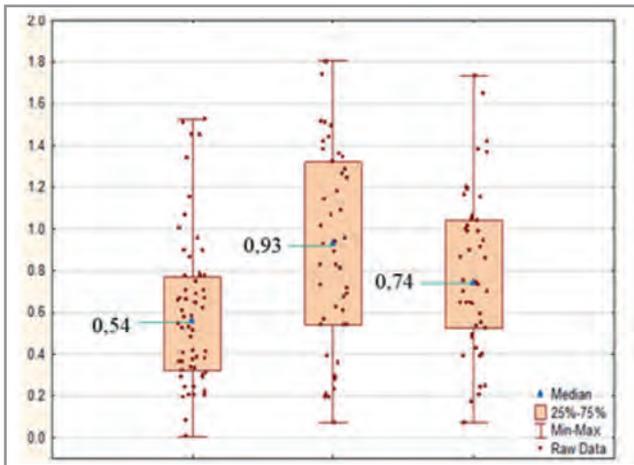


Рис. 2. Динамика уровня АТ к ГА гриппа А (H3N2) у больных РА на протяжении периода наблюдения, ед. ОП.

Примечание. $p_{I-II, I-III}=0,00002$.

Рис. 2. Dynamics of the level of antibodies to influenza A (H3N2) hemagglutinin in patients with RA during the observation period, optical density units.

Note. $P_{I-II, I-III}=0.00002$.

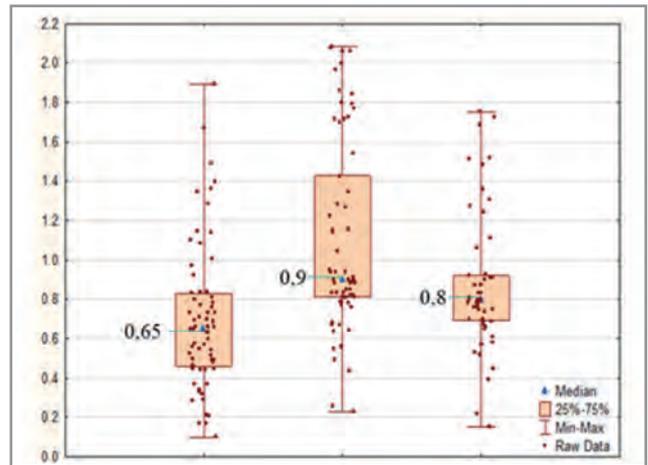


Рис. 4. Динамика уровня АТ к ГА гриппа А (H1N1) у больных АС и ПСА на протяжении периода наблюдения, ед. ОП.

Примечание. $p_{I-II, I-III}=0,000002$.

Рис. 4. Dynamics of the level of antibodies to influenza A (H1N1) hemagglutinin in patients with AS and PsA during the observation period, optical density units.

Note. $P_{I-II, I-III}=0.000002$.

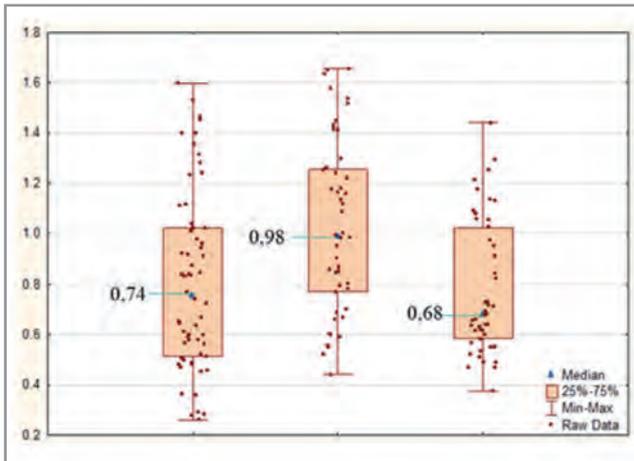


Рис. 3. Динамика уровня АТ к ГА вируса гриппа В у больных РА на протяжении периода наблюдения, ед. ОП.

Примечание. $p_{I-II}=0,0000009$; $p_{I-III}=0,8$.

Рис. 3. Dynamics of the level of antibodies to influenza B hemagglutinin in patients with RA during the observation period, optical density units.

Note. $P_{I-II}=0.0000009$; $P_{I-III}=0.8$.

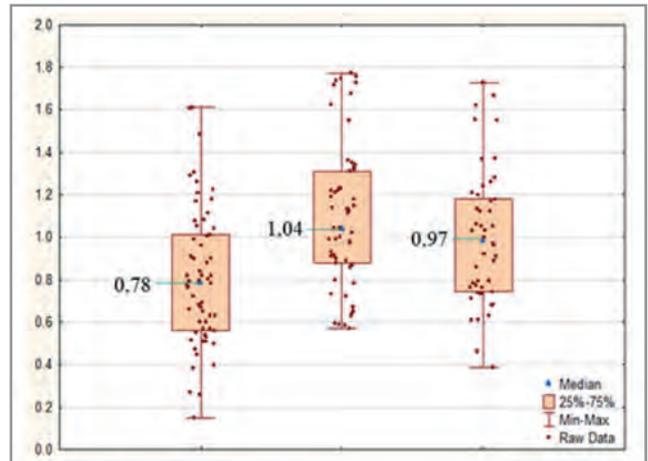


Рис. 5. Динамика уровня АТ к ГА гриппа А (H3N2) у больных АС и ПСА на протяжении периода наблюдения, ед. ОП.

Примечание. $p_{I-II, I-III}=0,000002$.

Рис. 5. Dynamics of the level of antibodies to influenza A (H3N2) hemagglutinin in patients with AS and PsA during the observation period, optical density units.

Note. $P_{I-II, I-III}=0.000002$.

вакцины выявлено следующее. В группе пациентов, получавших комбинированную терапию иФНО- α +МТ ($n=8$) значимого нарастания уровня АТ после вакцинации не отмечено ни по одному из штаммов, входящих в состав использованных вакцин. Через 6 мес. после вакцинации наблюдалось снижение уровня АТ с достижением значений, сопоставимых с исходными, у пациентов, получавших монотерапию иФНО- α (для штамма H3N2), МТ или ЛЕФ (для штамма В). Аналогичное снижение иммунного ответа отмечалось у пациентов 60 лет и старше (для штаммов H1N1 и В), а также у больных,

имевших высокую/умеренную активность ВЗС на момент вакцинации от гриппа (для штамма В).

За время наблюдения (6 мес. ежегодно от момента вакцинации) не зарегистрировано ни одного случая гриппа или ГПЗ у больных РА и ПСА. У двух пациентов с АС в эпидемическом сезоне 2021–2022 гг. зарегистрировано два случая, отвечающих критериям ГПЗ, согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [7]. При этом наблюдалось развитие лихорадки до 38,5°C, сопровождающейся общими симптомами (слабость, недомогание, головная

боль, миалгии, артралгии) и кашлем, у одного больного отмечались аносмия и дисгевзия. В первом случае экспресс-тест на SARS-CoV-2 был отрицательным, во втором — указанное исследование не выполнялось, ПЦР-исследования на SARS-CoV-2, равно как на вирусы гриппа А и В не проводились ни в одном случае. Вышеуказанные симптомы у обоих пациентов полностью купировались на фоне симптоматической терапии в течение 7–10 дней. В конце периода наблюдения каждый пациент, участвующий в исследовании, был опрошен на предмет сравнения прошедшего эпидемического сезона с предыдущим, т. е. до вакцинации. Ни один пациент не отметил нарастания частоты эпизодов инфекций верхних дыхательных путей.

Безопасность. Частота местных поствакцинальных реакций (ПВР) у пациентов с РА составила 18,3% (13 человек), системных ПВР — 5,6% (4 человека), у пациентов с АС и ПсА местные ПВР наблюдались у 11 человек (14,5%), системные ПВР — у 1 (1,3%), в КГ частота местных и системных ПВР составила 15,6% (15 человек) и 3,1% (3 человека), соответственно. Из местных ПВР чаще всего регистрировались боль и покраснение в месте инъекции, из системных — субфебрилитет, головная боль, першение в горле. У 2 пациентов зарегистрировано обострение атопического дерматита, в КГ — 1 случай системной аллергической реакции по типу крапивницы. Вместе с тем, коррекция противоревматической терапии не потребовалась ни в одном случае. Динамика индексов активности ИВРЗ была следующей: среднее значение DAS28 на визите II составило $3,01 \pm 1,1$, спустя 6 мес. после вакцинации — $2,6 \pm 1,1$ ($p_{I-II, I-III} \leq 0,02$), для индекса BASDAI значения на тех же визитах составили $3,1 \pm 1,7$ и $2,9 \pm 1,9$ ($p_{I-II, I-III} \leq 0,02$), для индекса DAPSA $10,4 \pm 8,7$ и $6,8 \pm 6,2$ ($p_{I-II, I-III} \geq 0,05$), соответственно. Таким образом, нами не было отмечено какого-либо значимого негативного влияния вакцинации на активность основного ИВРЗ. Увеличение площади поражения кожи псориазом, а также тяжести псориаза не зарегистрировано ни у одного больного. Развития каких-либо новых аутоиммунных феноменов также не наблюдали.

Обсуждение

Несмотря на новые подходы к диагностике и лечению, согласно данным ВОЗ, ежегодные эпидемии гриппа приводят примерно к 3–5 млн случаев тяжёлых форм заболевания и к 250–500 тыс. случаев смерти [7]. Пациенты с ИВРЗ входят в группу риска тяжёлого течения гриппа, что обуславливает актуальность проведения профилактических мероприятий, в том числе вакцинации среди данных больных. Однако имеющиеся опасения по поводу безопасности у пациентов с аутоиммунной пато-

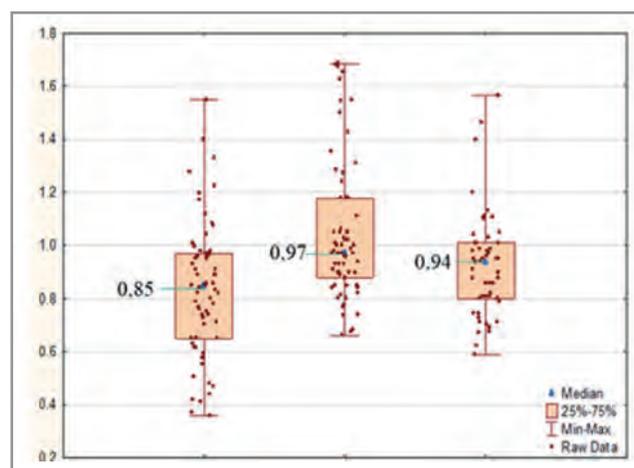


Рис. 6. Динамика уровня АТ к ГА гриппа В у больных АС и ПсА на протяжении периода наблюдения, ед. ОП. **Примечание.** $p_{I-II, I-III} = 0,000012$.

Рис. 6. Dynamics of the level of antibodies to influenza B hemagglutinin in patients with AS and PsA during the observation period, optical density units.

Note. $p_{I-II, I-III} = 0.000012$.

логией, а также потенциального снижения их эффективности на фоне приёма иммуносупрессивной терапии являются препятствиями к широкому применению гриппозных вакцин у больных ИВРЗ.

В нашем исследовании продемонстрирован достаточный уровень иммуногенности трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины у пациентов с РА, АС и ПсА, в первую очередь для наиболее вирулентного штамма гриппа — H1N1. Сохранение достоверного нарастания уровня поствакцинальных АТ ко всем трём штаммам вируса гриппа по прошествии 6 мес. после вакцинации наблюдалось у большинства пациентов. Вместе с тем, имевшее место снижение поствакцинального ответа к штамму гриппа В у больных РА (после окончания эпидемического сезона) подчёркивает необходимость ежегодной иммунизации даже при условии совпадения некоторых штаммов вируса гриппа в вакцинах разных сезонов.

Согласно данным литературы, применение МТ (в большей степени), а также иФНО- α может снижать иммуногенность гриппозных вакцин [8], что, по мнению ряда авторов, делает целесообразным временное прекращение терапии МТ в течение 2 нед. после вакцинации [9]. В нашей работе указанное негативное влияние на динамику поствакцинального ответа ко всем трём штаммам, входящим в состав использованных вакцин, наблюдалось в группе пациентов, получавших комбинированную терапию иФНО- α и МТ. Однако небольшое количество больных в данной группе терапии требует подтверждения указанной взаимосвязи на большей когорте пациентов с ВЗС.

Значительная часть имеющихся исследований посвящена иммуногенности гриппозных вакцин и влиянию различных факторов на показатели поствакцинального ответа, в то время как клиническая эффективность, которая по сути является целью вакцинации, не оценивается. Особенностью нашей работы было наблюдение пациентов с РА, АС и ПСА на протяжении всего эпидемического сезона, в ходе которого была продемонстрирована высокая клиническая эффективность инактивированной трёхвалентной гриппозной сплит-вакцины. Трактовка двух случаев, отвечающих критериям ГПЗ, зафиксированных в эпидемическом сезоне 2021–2022 гг., принимая во внимание циркуляцию SARS-CoV-2, а также сходность клинической симптоматики обоих заболеваний, с нашей точки зрения, представляется неоднозначной и не свидетельствует об абсолютной неэффективности вакцинации против гриппа у данных больных.

Одним из важных аспектов применения любых вакцин у больных ИВРЗ является их безопасность. В нашей работе частота ПВР, наблюдавшихся у больных ВЗС и в КГ, была сопоставимой. Тяжёлых ПВР не наблюдалось ни в одной из групп. В течение периода наблюдения активность ВЗС оставалась стабильной, включая как клинические, так и лабораторные (уровни СОЭ и СРБ) параметры. Случаев обострения кожного псориаза выявлено не было, что согласуется с данными других исследователей, подтвер-

дивших безопасность вакцин против гриппа у больных ВЗС [10, 11].

Заключение

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о высокой эффективности, достаточной иммуногенности (в том числе на фоне продолжающейся иммуносупрессивной терапии) и безопасности трёхвалентной инактивированной гриппозной сплит-вакцины у больных РА, АС и ПСА. Данная вакцина может быть рекомендована для широкого внедрения в практику ведения указанных пациентов.

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

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Участие авторов. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

Литература/References

1. *Blumentals W.A., Arreglado A., Napalkov P., Toovey S.* Rheumatoid arthritis and the incidence of influenza and influenza-related complications: a retrospective cohort study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012 Aug 27; 13: 158. doi: 10.1186/1471-2474-13-158.
2. *Bello S.L., Serafino L., Bonali C., Terlizzi N., Fanizza C., Anechino C., Lapadula G.* Incidence of influenza-like illness into a cohort of patients affected by chronic inflammatory rheumatism and treated with biological agents. *Reumatismo.* 2012 Dec 11; 64 (5): 299–306. doi: 10.4081/reumatismo.2012.299.
3. *Bower H., Frisell T., Di Giuseppe D., Delcoigne B., Askling J.* Influenza outcomes in patients with inflammatory joint diseases and DMARDs: how do they compare to those of COVID-19? *Ann Rheum Dis.* 2022; 81 (3): 433–439. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221461.
4. *Osterholm M.T., Kelley N.S., Sommer A., Belongia E.A.* Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12 (1): 36–44. doi: 10.1016/S1473-3099 (11)70295-X.
5. *Furer V., Rondaan C., Heijstek M.W., Agmon-Levin N., van Assen S. et al.* 2019 update of EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2020; 79 (1): 39–52. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215882.
6. *Bass A.R., Chakravarty E., Aki E.A., Bingham C.O., Calabrese L. et al.* 2022 American College of Rheumatology Guideline for Vaccinations in Patients With Rheumatic and Musculoskeletal Diseases. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2023; 75 (3): 449–464. doi: 10.1002/acr.25045.
7. Национальная ассоциация специалистов по инфекционным болезням имени академика В. И. Покровского, Российское научное общество терапевтов. Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации: Грипп у взрослых. 2022. Электронный ресурс — Режим доступа: https://medi.ru/klinicheskie-rekomendatsii/gripp-u-vzroslyh_27700/. Дата обращения: 23.01.2024. [National Association of Infectious Disease Specialists named after Acad-emician V. I. Pokrovsky, Russian Scientific Society of Therapists Clinical recommendations of the Ministry of Health of the Russian Federation: Influenza in adults. 2022. Elektronnyj resurs — Rezhim dostupa: https://medi.ru/klinicheskie-rekomendatsii/gripp-u-vzroslyh_27700/. Data obrashcheniya: 23.01.2024. (in Russian)]
8. *Friedman M.A., Curtis J.R., Winthrop K.L.* Impact of disease-modifying antirheumatic drugs on vaccine immunogenicity in patients with inflammatory rheumatic and musculoskeletal diseases. *Ann Rheum Dis.* 2021 Oct; 80 (10): 1255–1265. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221244.
9. *Park J.K., Lee Y.J., Shin K., Ha Y.J., Lee E.Y., Song Y.W., Choi Y., Winthrop K.L., Lee E.B.* Impact of temporary methotrexate discontinuation for 2 weeks on immunogenicity of seasonal influenza vaccination in patients with rheumatoid arthritis: a randomised clinical trial. *Ann Rheum Dis.* 2018 Jun; 77 (6): 898–904. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-213222.
10. *Miossi R., Fuller R., Moraes J.C., Ribeiro A.C., Saad C.G., Aikawa N.E., Miraglia J.L., Ishida M.A., Bonfa E., Caleiro M.T.* Immunogenicity of influenza H1N1 vaccination in mixed connective tissue disease: effect of disease and therapy. *Clinics (Sao Paulo).* 2013; 68 (2): 129–34. doi: 10.6061/clinics/2013 (02)oa02.
11. *Elkayam O., Amir S., Mendelson E., Schwaber M., Grotto I., Wollman J., Arad U., Brill A., Paran D., Levartovsky D., Wigler I., Caspi D., Mandelboim M.* Efficacy and safety of vaccination against pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus among patients with rheumatic diseases. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011 Jul; 63 (7): 1062–7. doi: 10.1002/acr.20465.

Поступила / Received 21.03.2024
Принята в печать / Accepted 10.04.2024

Информация об авторах

Баранова Марина Михайловна — младший научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5264-337X. ResearcherID: JDD-0658-2023, Scopus Author ID: 57222430929.

Муравьева Наталья Валерьевна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-4327-6720. ResearcherID: AAF-4853-2021. eLIBRARY SPIN-код: 8418-4469. Scopus Author ID: 57210263706

Белов Борис Сергеевич — д. м. н., заведующий лабораторией коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7091-2054. ResearcherID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN-код: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

Диатроптов Михаил Евгеньевич — д. б. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-6404-0042. ResearcherID: AAE-8411-2019. eLIBRARY SPIN-код: 7587-3702. Scopus Author ID: 8960133600

Буханова Дарья Валерьевна — к. м. н., медицинский советник АО Р-ФАРМ, Москва, Россия. ResearcherID: KFA-9103-2024. eLIBRARY SPIN-код: 6479-5386. Scopus Author ID: 57194624616

About the authors

Marina M. Baranova — junior researcher at the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5264-337X. ResearcherID: JDD-0658-2023, Scopus Author ID: 57222430929.

Natalia V. Muravyeva — Ph. D. in Medicine, Senior Researcher at the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-4327-6720. ResearcherID: AAF-4853-2021. eLIBRARY SPIN code: 8418-4469. Scopus Author ID: 57210263706

Boris S. Belov — D. Sc. in Medicine, Head of the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7091-2054. ResearcherID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN code: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

Mikhail E. Diatroptov — D. Sc. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Immunology and Molecular Biology of Rheumatic Diseases, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6404-0042. ResearcherID: AAE-8411-2019. eLIBRARY SPIN code: 7587-3702. Scopus Author ID: 8960133600

Daria V. Bukhanova — Ph. D. in Medicine, medical advisor at JSC R-PHARM, Moscow, Russia. ResearcherID: KFA-9103-2024. eLIBRARY SPIN code: 6479-5386. Scopus Author ID: 57194624616

Памяти Леонида Александровича Блатуна (29.03.1941 — 10.03.2024)

In Memory of L. A. Blatun (29.03.1941 — 10.03.2024)



10 марта 2024 г. ушёл из жизни Леонид Александрович Блатун.

Леонид Александрович родился 29 марта 1941 г. в местечке Круглое Могилевской области Белорусской ССР. После окончания в 1966 г. I Московского медицинского института им. И. М. Сеченова по специальности «лечебное дело» по распределению был зачислен в клиническую ординатуру Института хирургии им. А. В. Вишневского АМН СССР, где и проработал 57 лет.

В сферу научных и практических интересов Л. А. Блатуна входило изучение проблем лечения и профилактики хирургической инфекции и индивидуальный подбор курса оптимальной рациональной антибактериальной терапии.

В 1974 г. защитил кандидатскую диссертацию «Отдалённые результаты хирургического лечения открытого артериального протока».

С 1971 г. по 1974 г. работал врачом в лаборатории экспериментальной хирургии.

В 1974 г. по конкурсу был избран на должность младшего научного сотрудника отделения ран и раневой инфекции, а в 1975 г. — на должность старшего научного сотрудника в том же отделении.

В 1979–1980 гг. работал хирургом и руководил международной бригадой врачей в Эфиопии.

С 1981 г. работал старшим научным сотрудником лаборатории профилактики и лечения бактериальных инфекций Института хирургии им. А. В. Вишневского, а далее старшим научным сотрудником отдела ран и раневых инфекций ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России.

В 2017 г. прошёл повышение квалификации в Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н. И. Пирогова по специальности «клиническая фармакология»; в 2019 г. — повышение квалификации в Рязанском государственном медицинском университете им. акад. И. П. Павлова по специальности «хирургия»; в 2022 г. — повышение квалификации в Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования (РМАНПО) по специальности «клиническая фармакология».

Л. А. Блатун принимал участие в клинических испытаниях более 140 новых отечественных и зарубежных лекарственных препаратов (антибиотики, антисептики, мази, аэрозоли, раневые покрытия и др.) для лечения

раневой инфекции, многие из которых были рекомендованы для медицинского применения.

Под руководством Л. А. Блатуна в 1994 г. была выполнена и защищена кандидатская диссертация А. В. Аджидуку на тему «Хирургическое лечение гнойных ран с использованием гентамицина».

Леонид Александрович — автор 12 патентов на новые препараты для лечения ран.

За участие в разработке отечественных мазей на полиэтиленгликолевой основе от Института выдвигался на награждение Государственной премией. За активную научную, лечебную и общественную деятельность награжден знаком «Отличник здравоохранения».

За участие в ликвидации последствий техногенной катастрофы в Арзамасе (1988 г.) награжден медалью «За трудовую доблесть», имеет множество почетных грамот Минздрава России.

Л. А. Блатун был членом Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ESCMID), членом Европейской ассоциации по лечению ран (EWMA), членом Ассоциации хирургов им. Н. И. Пирогова, членом Общества хирургов Москвы и Московской области, одним из руководителей Региональной общественной организации «Хирургическое общество — Раны и раневые инфекции». Был постоянным консультантом санавиации СССР и Российской Федерации; членом редколлегии журнала «Раны и раневые инфекции. Журнал имени проф. Б. М. Костюченко».

Является автором более 350 научных работ, большинство из которых посвящено вопросам антибактериальной химиотерапии хирургической инфекции, местного медикаментозного лечения ран, соавтором руководств, монографий и методических рекомендаций по проблеме лечения раневых инфекций.

Леонид Александрович был врачом от Бога, другом и человеком с огромным сердцем!

Редколлегия, редакционный совет и редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия» выражают глубокое соболезнование родным и близким Леонида Александровича Блатуна и вместе с ними скорбят о его безвременной кончине.

Светлая память Леониду Александровичу!



Три активных компонента — комплексное действие



Усиливает барьерную функцию верхних дыхательных путей, за счет увеличения содержания секреторного иммуноглобулина А (sIg А)



Активизирует метаболическую активность клеток врожденного иммунитета



Повышает антиоксидантную защиту клеток и тканей

cytomed.ru

 **ЦИТОМЕД**

Увеличивает содержание секреторного иммуноглобулина А (sIg А) в слизистой носоглотки — входных воротах инфекции, повышая местную иммунорезистентность организма к респираторным инфекциям вирусной и бактериальной природы. При профилактическом действии препарат повышает потенциальную метаболическую активность клеток врожденного иммунитета (нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов), что, в случае развития инфекции, увеличивает их способность к поглощению и разрушению бактериальных и вирусных агентов за счет усиления ферментативной (окислительной) активности, синтеза катионных белков и увеличения числа фагоцитирующих клеток. При этом исходное состояние метаболической активности клеток врожденного иммунитета, в отсутствие инфекционных агентов, не изменяется, находясь в пределах нормальных значений.

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ, НЕОБХОДИМА КОНСУЛЬТАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТА