

ISSN 0235-2990

# АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 68



3-4'2023

Научно-практический журнал

Учредители:

Министерство здравоохранения  
Российской Федерации

Государственный научный  
центр по антибиотикам

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

**АДРЕС РЕДАКЦИИ:**

Нагатинская ул., д. 3а, Москва, 117105.  
Тел.: 89254723038  
E-mail: journalgnca@yandex.ru  
Зав. редакцией к. б. н. Л. Б. Смирнова  
Корректор: Е. А. Крыкова  
Перевод: О. С. Смирнова  
Сайт: www.antibiotics-chemotherapy.ru

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:**

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

**ИЗДАТЕЛЬ:**

Издательство «ОКИ»



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 2023

Свободная цена

ISSN 0235-2990

# АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 68

3–4'2023

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

**Главный редактор**

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

**Зам. главного редактора**

профессор, д. м. н. Яковлев С. В.

**Отв. за выпуск — Белоусов Д. Ю.**

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

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

**Научные редакторы**

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

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ**

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

**Founders:**

**Ministry of Health  
of the Russian Federation**

**State Scientific Center for Antibiotics**

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

**Founded in 1956**

**Editorial office address:**

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

**Advertising Department:**

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

**Publisher:**

Izdatelstvo «OKI»



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

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

Circulation: 5000 copies

Tipography:  
OOO «Litera»

Release Date: April 2023  
Free price

ISSN 0235-2990

# ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Volume 68

3–4'2023

MONTHLY JOURNAL

**Editor-in-Chief**

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

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

**MEMBERS OF EDITORIAL BOARD**

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

**Scientific Editors**

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

**MEMBERS OF EDITORIAL BOARD**

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

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

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

### Оригинальные статьи

- Зарубаев В. В., Смирнов В. С., Кудрявцева Т. А., Петленко С. В., Слита А. В., Хоанг Мин, Заплутанов В. А.  
Изучение механизма противовирусной активности препарата Цитовир®-3 в отношении респираторных вирусов *in vitro*  
Синёва О. Н., Садыкова В. С., Бычкова О. П., Иванкова Т. Д., Малышева К. В., Маркелова Н. Н.  
Антибиотический потенциал морских актиномицетов родов *Streptomyces* и *Nocardioopsis*  
Бегунов Р. С., Егоров Д. О., Четвертакова А. В., Савина Л. И., Зубишина А. А.  
Антибактериальная активность галоген- и нитропроизводных бензимидазола в отношении *Bacillus subtilis*  
Кузнецова Т. А., Смолина Т. П., Иванушко Л. А., Персиянова Е. В., Сильченко А. С., Беседнова Н. Н.  
*In vitro* и *in vivo* иммуноадьювантные эффекты модифицированного ферментативным гидролизом фукоидана  
Габитова Н. М., Цибизова А. А., Озеров А. А., Самотруева М. А.  
Оценка острой токсичности производного хиназолина 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил] хинолин-4(3h)-он, активного в отношении условно-патогенных микроорганизмов  
Стяжкина С. Н., Кирьянов Н. А., Куклин Д. Н., Кутбединов Х. С., Ейкина О. Н., Страшинов Д. В.  
Оценка антисептического действия раствора Анолит на лабораторных крысах

### Клинические исследования и практика

- Богущ Т. А., Поцелуева П. Д., Щербачков А. М., Богущ Е. А., Равчеева А. Б., Вихлянцева Н. О., Косоруков В. С.  
Ассоциация экспрессии эстрогеновых рецепторов бета с показателем пролиферативной активности Ki-67 в ткани рака молочной железы  
Камбачокова З. А., Ахжубекова З. А., Арамисова Р. М., Альтудова Д. Е., Кагазежева Л. А., Шокуева М. А., Камбачокова А. А., Канкулова А. Б., Урусбиев А. М., Юсуфзай Абдул Ваджид, Кочесокова И. А.  
Клинико-лабораторная характеристика больных с COVID-19 на фоне сердечно-сосудистых заболеваний  
Гомон Ю. М., Колбин А. С., Фахрутдинова А. М., Усманова Т. А., Султанова Ф. М., Балькина Ю. Е.  
Систематический обзор с метаанализом и непрямым сравнением эффективности антиинтерлейкиновой терапии COVID-19

### Обзоры

- Даудова А. Д., Демина Ю. З., Генатуллина Г. Н., Абдрахманова Р. О., Баева Г. Р., Ясенявская А. Л., Рубальский О. В.  
Антибиотикорезистентность. Вызов современности  
Варганов М. В., Микличев А. А., Свидерский И. В.  
Обоснование сочетанного применения терапии отрицательным давлением и меглюмина натрия сукцината при лечении ран различной этиологии  
Белов Б. С., Муравьева Н. В.  
Бактериальный (септический) артрит

### Некролог

Памяти Н. Н. Климки

### Original Articles

- 4 Zarubaev Vladimir V., Smirnov Vyacheslav S., Kudryavtseva Tatiana A., Petlenko Sergey V., Slita Alexander V., Hoang Minh, Zaplutanov Vasily A.  
Study of the Mechanism of Antiviral Activity of Cytovir®-3 Against Respiratory Viruses *In Vitro*  
11 Sineva Olga N., Sadykova Vera S., Bychkova Olga P., Ivankova Tatiana D., Malysheva Ksenia V., Markelova Natalia N.  
Antibiotic Potential of Marine Actinomycetes of the Genera *Streptomyces* and *Nocardioopsis*  
19 Begunov Roman S., Egorov Dmitriy O., Chetvertakova Anna V., Savina Luiza I., Zubishina Alla A.  
Antibacterial Activity of the Halogen- and Nitro Derivatives of Benzimidazole Against *Bacillus Subtilis*  
25 Kuznetsova Tatyana A., Smolina Tatyana P., Ivanushko Ludmila A., Persyanova Elena V., Silchenko Artem S., Besednova Natalia N.  
*In vitro* and *in vivo* Immunoadjuvant Effects of the Enzymatically Modified Fucoidan  
30 Gabitova Narmina M., Tsbizova Alexandra A., Ozerov Alexander A., Samotrueva Marina A.  
Assessment of Acute Toxicity of Quinazoline Derivative 3-[2-oxo-2-(4-Phenylpiperazine-1-yl)ethyl]quinazoline-4(3h)-oh Active against Opportunistic Microorganisms  
35 Styazhkina Svetlana N., Kiryanov Nikolay A., Kuklin Dmitry N., Kutbedinov Khadiatullo S., Eykina Olga N., Strashnov Danil V.  
Evaluation of the Antiseptic Effect of the Anolyte Solution on Laboratory Rats

### Clinical Research and Practice

- 39 Bogush Tatiana A., Potselueva Polina D., Scherbakov Alexander M., Bogush Elena A., Ravcheeva Anna B., Vikhlyantseva Nadezhda O., Kosorukov Vyacheslav S.  
Association of the Estrogen Receptors Beta Expression with the Ki-67 Proliferative Index in Breast Cancer  
46 Kambachokova Zareta A., Akhkubekova Zukhra A., Aramisova Rina M., Altudova Darina E., Kagazheva Lyana A., Shokueva Milana A., Kambachokova Amina A., Kankulova Alina B., Urusbiev Astemir M., Yusufzai Abdul Vadzhid, Kochesokova Irina A.  
Clinical and Laboratory Characteristics of Patients with COVID-19 on the Background of Cardiovascular Diseases  
52 Gomon Yuliya M., Kolbin Alexey S., Fahrutdinova Aigul M., Usmanova Tatiana A., Sultanova Flora M., Balykina Yulia E.  
A Systematic Review with Meta-Analysis and Indirect Comparison of the Effectiveness of COVID-19 Anti-Interleukin Therapy

### Reviews

- 66 Daudova Adilya D., Demina Julia Z., Genatullina Guzel N., Abdrakhmanova Radmila O., Baeva Guzel R., Yasenyavskaya Anna L., Rubalsky Oleg V.  
Antibacterial Resistance. The Challenge of Modernity  
76 Varganov Mikhail V., Miklichev Alexey A., Svidersky Ilya V.  
Substantiation of the Combined Use of Negative Pressure Therapy and Meglumine Sodium Succinate in the Treatment of Wounds of Various Etiologies  
84 Belov Boris S., Muravyeva Natalia V.  
Bacterial (Septic) Arthritis

### Obituary

In Memory of N. N. Klimko

\* 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.

# Изучение механизма противовирусной активности препарата Цитовир®-3 в отношении респираторных вирусов *in vitro*

В. В. ЗАРУБАЕВ<sup>1</sup>, В. С. СМИРНОВ<sup>1</sup>, \*Т. А. КУДРЯВЦЕВА<sup>2</sup>, С. В. ПЕТЛЕНКО<sup>3</sup>,  
А. В. СЛИТА<sup>1</sup>, МИН ХОАНГ<sup>4</sup>, В. А. ЗАПЛУТАНОВ<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Институт Пастера, Хошимин, Вьетнам

<sup>5</sup> АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия

## Study of the Mechanism of Antiviral Activity of Cytovir®-3 Against Respiratory Viruses *In Vitro*

VLADIMIR V. ZARUBAEV<sup>1</sup>, VYACHESLAV S. SMIRNOV<sup>1</sup>, \*TATIANA A. KUDRYAVTSEVA<sup>2</sup>,  
SERGEY V. PETLENKO<sup>3</sup>, ALEXANDER V. SLITA<sup>1</sup>, HOANG MINH<sup>4</sup>, VASILY A. ZAPLUTANOV<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Scientific and Clinical Center of Toxicology Named after Academician S.N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency», Saint-Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Pasteur Institute, Ho Chi Minh, Vietnam

<sup>5</sup> Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology», Saint-Petersburg, Russia

### Резюме

**Введение.** Требования современных клинических рекомендаций по лечению респираторных вирусных инфекций предполагают возможность идентификации конкретного вирусного возбудителя. В связи с этим является актуальным поиск лекарственных препаратов с избирательной активностью в отношении респираторно-синцитиального вируса и вируса парагриппа, которые имеют широкое распространение в структуре спорадической и сезонной заболеваемости ОРВИ. **Цель исследования** — изучение противовирусной активности препарата Цитовир®-3 *in vitro* в отношении цитопатогенного действия респираторных вирусов (вирус парагриппа и респираторно-синцитиальный вирус). **Материал и методы.** На культуре клеток Vero было изучено противовирусное действие препарата Цитовир®-3 в сравнении с препаратом Умифеновир в отношении вируса парагриппа и респираторно-синцитиального вируса. Лекарственные препараты вводили за 1 ч до (профилактическая схема) и 1 ч после (лечебная схема) заражения клеточной культуры респираторными вирусами. Рабочий диапазон концентраций исследуемых препаратов рассчитывался исходя из значений 50% цитотоксической концентрации, рассчитанной на основании результатов количественного микротетразолиевого теста. **Результаты и обсуждение.** Препарат Цитовир®-3 в двух схемах применения (лечебной или профилактической) проявил противовирусную эффективность *in vitro* в отношении респираторно-синцитиального вируса и вируса парагриппа в нетоксическом диапазоне (0–794 мкг/мл). При этом подавляющее действие препарата Цитовир®-3 в отношении вируса парагриппа начинается при более низких концентрациях препарата при его заблаговременном (профилактическом) введении в культуру клеток (250 мкг/мл). **Заключение.** Доказана противовирусная активность *in vitro* препарата Цитовир®-3 в отношении вируса парагриппа и респираторно-синцитиального вируса. При этом во всех сериях опытов Цитовир®-3 имел более высокий индекс селективности противовирусного действия, чем у препарата сравнения Умифеновир.

**Ключевые слова:** Цитовир®-3; Vero; вирусная цитопатогенность *in vitro*; противовирусное действие; респираторно-синцитиальный вирус; вирус парагриппа

**Для цитирования:** Зарубаев В. В., Смирнов В. С., Кудрявцева Т. А., Петленко С. В., Слита А. В., Хоанг Минь, Заплутанов В. А. Изучение механизма противовирусной активности препарата Цитовир®-3 в отношении респираторных вирусов *in vitro*. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-4-10>.

### Abstract

**Introduction.** The requirements of modern clinical guidelines for the treatment of respiratory viral infections suggest the possibility of identifying a specific viral pathogen. In this regard, the search for drugs with selective activity against respi-

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: ул. Мира, 14, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г. Санкт-Петербург, Россия, 197101.  
E-mail: tatjana\_ku@inbox.ru

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 14 Mira str., St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, 197101 Russia. E-mail: tatjana\_ku@inbox.ru

ratory syncytial virus and parainfluenza virus is relevant. *The purpose* of the work is to study the antiviral activity of the drug Cytovir®-3 *in vitro* in relation to the cytopathogenic effect of respiratory viruses (parainfluenza virus and respiratory syncytial virus). *Material and methods.* The antiviral effect of Cytovir®-3 in comparison with Umifenovir against parainfluenza virus and respiratory syncytial virus was studied on Vero cell culture. Drugs were administered 1 hour before (prophylactic regimen) and 1 hour after (treatment regimen) infection of the cell culture with respiratory viruses. The working range of concentrations of the studied drugs was calculated based on the values of 50% cytotoxic concentration calculated based on the results of a quantitative microtetrazole test. *Results and discussion.* The drug Cytovir®-3 in two schemes of application (therapeutic or prophylactic) showed its antiviral efficacy *in vitro* against respiratory syncytial virus and parainfluenza virus due in the non-toxic range (0–794 µg/ml). At the same time, the suppressive effect of the drug Cytovir®-3 against the parainfluenza virus begins at lower concentrations of the drug with its early (preventive) introduction into cell culture (250 mcg/ml). *Conclusion.* Antiviral activity of Cytovir®-3 has been proven *in vitro* against parainfluenza virus and respiratory syncytial virus. At the same time, in all series of experiments, Cytovir®-3 had a higher index of selectivity of antiviral action than that of the comparison drug Umifenovir.

**Key words:** Cytovir®-3; Vero; viral cytopathogenicity; *in vitro*; antiviral effect; respiratory syncytial virus; parainfluenza virus

**For citation:** Zarubaev V. V., Smirnov V. S., Kudryavtseva T. A., Petlenko S. V., Slita A. V., Minh H., Zaplutanov V. A. Study of the mechanism of antiviral activity of Cytovir®-3 against respiratory viruses *in vitro*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-4-10>.

## Введение

Респираторные вирусы, тропные к мерцательному эпителию респираторного тракта, являются частой причиной инфекций верхних и нижних дыхательных путей человека и оказывают значительное влияние на показатели госпитализации и смертности в России и мире [1]. В настоящее время они рассматриваются в качестве основных этиологических агентов респираторных заболеваний у детей моложе 5 лет, взрослых людей с ослабленной иммунной системой и у лиц в возрасте старше 65 лет [2–4]. Высокие показатели летальности в период сезонного подъёма заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями в указанных группах пациентов, а также у пациентов с хроническими заболеваниями лёгких, являются актуальной проблемой для систем общественного здравоохранения во многих странах независимо от уровня их экономического развития [4]. Серьёзную озабоченность вызывает также эмпирическое назначение антибиотиков больным острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ) из-за отсутствия специфической клинической симптоматики и сложностей в этиологической расшифровке заболеваний по причине недостаточного количества доступных быстрых и чувствительных методов лабораторной диагностики. Неадекватная антибиотикотерапия способствует развитию резистентности микрофлоры заболевших к антимикробным препаратам и задерживает проведение у них надлежащих лечебных мероприятий [5].

К респираторным вирусам — возбудителям ОРВИ — в настоящее время относят вирусы парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы гриппа, метапневмовирус человека, риновирусы, коронавирусы, аденовирусы и бокавирус человека [1]. Респираторно-синцитиальный вирус человека представляет собой основную причину бронхолёгочных заболеваний (нижних ды-

хательных путей) у детей младшего и среднего возраста [6]. Пандемия COVID-19 привела к серьёзным изменениям в этиологической структуре ОРВИ, при этом нарушились и стабильная сезонность, и известная частота выявления различных респираторных инфекций. Так, при введении карантинных мероприятий в мире наблюдалось ожидаемое падение заболеваемости, подкреплённое явлением интерференции вирусов [7]. Однако после постепенной отмены ограничительных мероприятий в различных странах наметилась тенденция к повышению частоты и, особенно, тяжести острой РСВ-инфекции как в качестве самостоятельной нозологической формы, так и в сочетании с риновирусом и парагриппом [8, 9].

Вместе с тем, даже при выполнении целенаправленных мероприятий по определению этиологии респираторных инфекций, примерно в 20% случаев выявить возбудитель ОРВИ не удаётся. Это связано не только с техническими проблемами верификации патогенов, но и с тем, что далеко не все респираторные вирусы известны, о чём свидетельствуют продолжающиеся открытия новых возбудителей ОРВИ у человека [10]. Тем не менее в российских клинических рекомендациях по ОРВИ приведены клинические критерии по дифференциальной диагностике возбудителей ОРВИ, а по некоторым специфическим возбудителям (вирусы гриппа типа А и В, новой коронавирусной инфекции — SARS-CoV-2) существуют отдельные руководящие документы [11].

В этой связи весьма актуальным является поиск и исследование известных лекарственных препаратов на предмет наличия у них избирательной противовирусной активности в отношении конкретных респираторных вирусов [12].

*Цель исследования* — изучение противовирусной активности препарата Цитовир®-3 *in vitro* по влиянию на цитопатогенное действие респираторных вирусов (вирус парагриппа и респираторно-синцитиальный вирус).

## Материал и методы

**Образцы исследуемых препаратов.** Для изучения противовирусного действия в эксперименте был использован препарат Цитовир®-3 — смесь активных действующих веществ (аналог его лекарственных форм — порошка, капсул и сиропа): альфа-глутамил-триптофан, аскорбиновая кислота, бендазола гидрохлорид. Состав действующих веществ на одну капсулу: альфа-глутамил-триптофан (Тимоген® натрий) — 0,5 мг, аскорбиновая кислота — 50 мг, бендазола гидрохлорид (дибазол) — 20 мг. В качестве препарата сравнения при исследовании препарата Цитовир®-3 использовалась субстанция умифеновира. Выбор данной субстанции обусловлен тем, что лекарственные препараты, содержащие в своём составе активное действующее вещество умифеновир, согласно инструкции по медицинскому применению (раздел «Фармакодинамика»), обладают широким спектром противовирусной активности, в том числе подавляя *in vitro* вирусы — возбудители ОРВИ (в том числе респираторно-синцитиальный вирус и вирус парагриппа).

**Вирус и культура клеток.** В исследовании использовали следующие вирусы из коллекции вирусных штаммов НИИЭМ им. Пастера:

- респираторно-синцитиальный вирус человека (RSV, штамм Long);
- вирус парагриппа человека 3-го типа.

Вирусы накапливали в клетках перmissive линии Vero (ATCC CCL-81). Клетки рассевали на культуральные матрасы площадью 75 см<sup>2</sup>, заражали вирусами в дозе 0,1 TCID<sub>50</sub> на клетку и культивировали до появления специфического ЦПД в 90–100% клеток. Клетки с культуральной жидкостью замораживали и после размораживания делили на аликвоты и хранили при температуре –80°C до постановки соответствующих экспериментов.

**Оценка цитотоксичности препаратов.** Изучение токсичности соединений проводили на основе оценки жизнеспособности клеток при помощи реакции восстановления тетразолиевого красителя МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид) клетками в культуре, интенсивность которой отражает степень жизнеспособности клеток в результате восстановления красителя митохондриальными и частично цитоплазматическими дегидрогеназами [13].

Клетки Vero рассевали на 96-луночные планшеты (NEST, Китай, кат. #701001) и после формирования монослоя вносили изучаемые препараты в диапазоне концентраций 12–1000 мкг/мл (Цитовир®-3, субстанция умифеновир), растворённые в среде для культивирования клеток в объёме 200 мкл. Планшеты инкубировали в течение 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По истечении срока инкубации клетки промывали средой MEM и в лунки планшетов добавляли по 100 мкл раствора (0,5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазолил-2) 2,5-дифенилтетразолия бромид на среде для клеток. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 ч и промывали в течение 5 мин физиологическим раствором. Осадок растворяли в 100 мкл ДМСО на лунку, после чего оптическую плотность измеряли с помощью планшетного анализатора Multiscan FC (Thermo Scientific) при длине волны 540 нм. На основании полученных данных рассчитывали 50% цитотоксическую концентрацию (CC<sub>50</sub>), т. е. концентрацию соединения, снижающую оптическую плотность в лунках вдвое по сравнению с контрольными клетками без препаратов. Расчёт проводили при помощи пакета программ GraphPad Prism v.6.01.

**Оценка цитопротекторной активности исследуемых препаратов *in vitro*.** Клетки Vero рассевали на 96-луночные планшеты (NEST, Китай, кат. #701001) и после формирования монослоя вносили изучаемые препараты в трехкратных разведениях в диапазоне концентраций 16–1000 мкг/мл (1,6–100% в разведении) для препарата Цитовир®-3 и субстанции умифеновир. Препараты вносили за 1 ч до заражения (аналог профилактической схемы применения) или через 1 ч после заражения (аналог лечебной схемы применения). Клетки заражали соответствующими

вирусами при множественности инфицирования 0,01 TCID<sub>50</sub> на клетку. На каждую концентрацию препарата использовали 4 лунки планшета. После инкубации в течение 72 ч действие вирусов оценивали по развитию специфического вирусного ЦПД. О цитопротекторной эффективности препаратов судили по их способности тормозить развитие вирусного ЦПД. За титр исследуемого препарата принимали величину, обратную разведению, при котором монослой клеток был полностью защищён от цитопатического действия вируса в 50% лунок. Титр вычисляли методом Спирмена–Кербера по формуле:

$$\log_2 ED_{50} = D_{max} + \frac{d}{n} \times (p - \frac{n}{2}),$$

где  $\log_2 ED_{50}$  — двоичный логарифм титра исследуемого препарата;  $D_{max}$  — двоичный логарифм титра, ниже которого произошла 100% защита (–);  $d$  — двоичный логарифм интервала между разведениями, равный 1;  $n$  — число лунок на каждую дозу, равное 4;  $p$  — число лунок, давших защиту (–) в разведении, ниже которого произошла 100% защита, и последующих разведениях.

По полученным в исследовании значениям ED<sub>50</sub> и CC<sub>50</sub> определяли значение 50% ингибирующей концентрации препаратов (IC<sub>50</sub>) и индекс селективности препарата (SI). SI, характеризующий избирательность ингибирующего действия препарата в отношении вируса по сравнению с действием на клетки, определяли, как отношение CC<sub>50</sub> к IC<sub>50</sub>.

**Статистическая оценка.** Статистическую обработку полученных количественных данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 365. Для сравнения двух независимых групп использовался непараметрический критерий U Манна–Уитни.

## Результаты и обсуждение

**Оценка цитотоксичности препаратов.** На первом этапе исследования были изучены цитотоксические свойства препарата Цитовир®-3 для культуры клеток, в дальнейшем используемой в вирусологических экспериментах. Результаты изучения цитотоксических свойств препарата Цитовир®-3 представлены в табл. 1 и для наглядности суммированы на рисунке. В качестве препарата сравнения использовали субстанцию умифеновир, используемую в клинической практике для профилактики и лечения респираторных вирусных инфекций.

Как видно из представленных результатов, препарат сравнения Умифеновир даже в наибольшей из использованных концентраций не приводил к достоверному снижению оптической плотности в лунках планшета с клетками, что говорит о том, что его значение CC<sub>50</sub> выше 1000 мкг/мл. В то же время Цитовир®-3 в дозе 1000 мкг/мл приводил к снижению жизнеспособности клеток на 50% и более, что позволяет оценить значение его CC<sub>50</sub> как 794 мкг/мл (см. рисунок).

На основании полученных данных изучения цитотоксичности выявлен нетоксический диапазон концентраций для препарата Цитовир®-3, имеющий значение 0–794 мкг/мл, в котором проводили дальнейшие исследования по противовирусной активности препарата.

**Изучение противовирусной активности препаратов.** Прямая противовирусная активность препарата Цитовир®-3 в отношении вируса пара-

**Таблица 1. Цитотоксические свойства препаратов Цитовир®-3 и Умифеновир в культуре клеток Vero (ATCC CCL-81)****Table 1. Cytotoxic properties of Cytovir®-3 and Umifenovir preparations in Vero cell culture (ATCC CCL-81)**

Препарат	Оптическая плотность (OD <sub>540</sub> ) в лунках с клетками при концентрации препарата, мкг/мл					
	0 (контроль клеток)	1000 (100*)	333 (33,3*)	111 (11,1*)	37 (3,7*)	12 (1,2*)
Цитовир®-3	0,684±0,108	0,310±0,035	0,645±0,031	0,520±0,036	0,585±0,079	0,654±0,067
Умифеновир	0,747±0,088	0,705±0,041	0,761±0,040	0,659±0,047	0,633±0,025	0,644±0,035

**Примечание.** \* — концентрация (%) ГЛС в разведении.

**Note.** \* — concentration (%) of GLS in dilution.

гриппа и респираторно-синцитиального вируса была изучена в тесте на подавление вирусного цитопатогенного действия в культуре клеток. Результаты изучения активности Цитовир®-3 в сравнении с аналогичными характеристиками препарата сравнения Умифеновир суммированы в табл. 2–5.

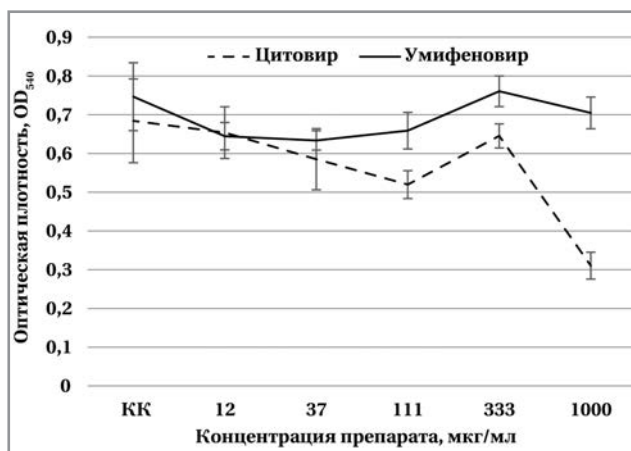
В результате опытов 2-го этапа (табл. 2) по изучению противовирусной активности препаратов при их профилактической схеме введения за 1 ч до заражения клеток Vero вирусом парагриппа в опытах *in vitro* было выявлено, что препараты Цитовир®-3 и Умифеновир обеспечивают 50% ингибирование вирусной активности в нетоксических концентрациях 250 мкг/мл и 297,3 мкг/мл, соответственно.

При этом 100% ингибирования вирусной активности Цитовир®-3 достиг при нетоксической концентрации препарата 500 мкг/мл, а Умифеновир при 1000 мкг/мл. Это обеспечило более высокий индекс селективности противовирусного действия препарата (SI) у Цитовир®-3 по сравнению с препаратом Умифеновир (4,0 и 3,4, соответственно).

Изучение противовирусной активности препаратов при лечебной схеме введения через 1 ч после заражения клеток Vero вирусом парагриппа показало (см. табл. 3), что препарат Умифеновир обеспечивал 50% подавление вирусной активности при концентрации 500 мкг/мл. Препарат Цитовир®-3 в концентрации 250 мкг/мл снижал вирусную активность на 25%, а его 50% ингибирующая концентрация составила 297,3 мкг/мл.

Как и при профилактической схеме применения, 100% ингибирования вирусной активности Цитовир®-3 достиг при нетоксической концентрации препарата 500 мкг/мл, а Умифеновир при 1000 мкг/мл. При лечебной схеме введения препаратов Цитовир®-3 также показал более высокий индекс селективности (SI) по сравнению с препаратом Умифеновир (3,4 и 2,0, соответственно).

На 2-м этапе опытов по изучению противовирусной активности препаратов при их профилактической схеме введения за 1 ч до заражения клеток Vero респираторно-синцитиальным вирусом было выявлено (см. табл. 4), что препарат Ци-

**Цитотоксические свойства препаратов Цитовир®-3 и Умифеновир в культуре клеток Vero.****Cytotoxic properties of Cytovir®-3 and Umifenovir preparations in Vero cell culture****Таблица 2. Противовирусная активность препаратов в отношении вируса парагриппа в культуре клеток Vero при профилактической схеме внесения (введение препаратов за 1 ч до заражения)****Table 2. Antiviral activity of drugs against parainfluenza virus in Vero cell culture with a preventive application scheme (administration of drugs 1 hour before infection)**

Концентрация препарата, мкг/мл	Количество лунок с ЦПД (ЦПД/всего инфицированных лунок в присутствии препарата)	
	Цитовир®-3	Умифеновир
1000	Цитотоксичность	0/4***
500	0/4***	1/4
250	2/4	2/4
125	4/4	4/4
62,5	4/4	4/4
32	4/4	4/4
16	4/4	4/4
Контроль вируса	4/4	4/4
IC <sub>50</sub> , мкг/мл	250**	297,3**
SI	4,0	3,4

**Примечание.** Здесь и табл. 3–5: \*\* — расчётная 50% ингибирующая концентрация препаратов (IC<sub>50</sub>); \*\*\* — достижение 100% ингибирования вирусной активности.

**Note.** Here and Tables 3–5: \*\* — estimated 50% inhibitory concentration of drugs (IC<sub>50</sub>); \*\*\* — achievement of 100% inhibition of viral activity



товир®-3 снижал вирусную активность на 50% в нетоксической концентрации 105,1 мкг/мл. В то же время 50% ингибирующая концентрация препарата Умифеновир составила 353,6 мкг/мл.

100% ингибирования вирусной активности Цитовир®-3 достиг при нетоксической концентрации препарата 250 мкг/мл, а Умифеновир при 500 мкг/мл. В этой серии опытов индекс селективности противовирусного действия препарата (SI) у Цитовир®-3 оказался значительно выше, чем у препарата Умифеновир (в 3,4 раза — 9,5 и 2,8, соответственно).

При лечебной схеме применения (через 1 ч после заражения клеток Vero респираторно-синцитиальным вирусом) оба исследуемых препарата обеспечивали 50% подавление вирусной активности в концентрациях 125 мкг/мл (IC<sub>50</sub> для препарата Цитовир®-3 составил 105,1 мкг/мл, Умифеновир — 210,2 мкг/мл). 50% ингибирующая концентрация препарата Цитовир®-3 составила 297,3 мкг/мл (см. табл. 5).

100% ингибирования вирусной активности Цитовир®-3 достиг при нетоксической концентрации препарата 250 мкг/мл, а Умифеновир только при 1000 мкг/мл, что и повлияло на то, что в лечебной схеме введения препаратов Цитовир®-3 также показал более высокий индекс селективности (SI) по сравнению с препаратом Умифеновир (9,5 и 4,8, соответственно).

Как следует из представленных данных, оба исследуемых препарата, Цитовир®-3 и Умифеновир, во всех четырёх сериях опытов по изучению противовирусной активности в отношении HPIV и RSV в лечебных и профилактических схемах введения показали эффективность за счёт подавления цитопатического действия вируса в нетоксических концентрациях.

Необходимо отметить, что индекс селективности противовирусного действия препарата Цитовир®-3 оказался выше, чем таковой у препарата Умифеновир во всех сериях опытов, достигая наибольшей разницы при профилактическом введении в отношении респираторно-синцитиального вируса.

В отношении вируса парагриппа было выявлено, что Цитовир®-3 при профилактическом введении проявляет большую активность по сравнению с лечебной схемой применения.

При изучении противовирусной активности препаратов в отношении респираторно-синцитиального вируса показано, что препарат Цитовир®-3 независимо от схемы введения (лечебной или профилактической) проявил свою эффективность *in vitro* за счёт 50% снижения вирусной активности в концентрации 105,1 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствуют о его избирательном действии на респираторно-синцитиальный вирус, что

**Таблица 3.** Противовирусная активность препаратов в отношении вируса парагриппа в культуре клеток Vero при лечебной схеме внесения (введение препаратов через 1 ч после заражения)

**Table 3.** Antiviral activity of drugs against parainfluenza virus in Vero cell culture with a therapeutic application scheme (administration of drugs 1 hour after infection)

Концентрация препарата, мкг/мл	Количество лунок с ЦПД (ЦПД/всего инфицированных лунок в присутствии препарата)	
	Цитовир®-3	Умифеновир
1000	Цитотоксичность	0/4***
500	0/4***	2/4*
250	3/4	4/4
125	4/4	4/4
62,5	4/4	4/4
32	4/4	4/4
16	4/4	4/4
Контроль вируса	4/4	4/4
IC <sub>50</sub> , мкг/мл	297,3**	500**
SI	3,4	2,0

**Таблица 4.** Противовирусная активность препаратов в отношении респираторно-синцитиального вируса в культуре клеток Vero при профилактической схеме внесения (введение препаратов за 1 ч до заражения)

**Table 4.** Antiviral activity of drugs against respiratory syncytial virus in Vero cell culture with a preventive application scheme (administration of drugs 1 hour before infection)

Концентрация препарата, мкг/мл	Количество лунок с ЦПД (ЦПД/всего инфицированных лунок в присутствии препарата)	
	Цитовир®-3	Умифеновир
1000	Цитотоксичность	0/4
500	0/4	0/4***
250	0/4***	4/4
125	2/4	4/4
62,5	3/4	4/4
32	4/4	4/4
16	4/4	4/4
Контроль вируса	4/4	4/4
IC <sub>50</sub> , мкг/мл	105,1**	353,6**
SI	9,5	2,8

**Таблица 5.** Противовирусная активность препаратов в отношении респираторно-синцитиального вируса в культуре клеток Vero при лечебной схеме внесения (введение препаратов через 1 ч после заражения)

**Table 5.** Antiviral activity of drugs against respiratory syncytial virus in Vero cell culture with a therapeutic application scheme (administration of drugs 1 hour after infection)

Концентрация препарата, мкг/мл	Количество лунок с ЦПД (ЦПД/всего инфицированных лунок в присутствии препарата)	
	Цитовир®-3	Умифеновир
1000	Цитотоксичность	0/4***
500	0/4	1/4
250	0/4***	2/4
125	2/4	2/4
62,5	3/4	4/4
32	4/4	4/4
16	4/4	4/4
Контроль вируса	4/4	4/4
IC <sub>50</sub> , мкг/мл	105,1**	210,2**
SI	9,5	4,8

подтверждается более высоким индексом селективности (9,5 как при лечебном, так и при профилактическом использовании).

Оба исследуемых препарата достигали 100% инактивации вирусов в нетоксическом диапазоне концентраций во всех сериях опытов по исследованию противовирусной активности, что свидетельствует об их высоком профиле безопасности *in vitro* (профилактическая схема введения при изучении влияния на вирус парагриппа: 500 мкг для препарата Цитовир®-3 и 1000 мкг для препарата Умифеновир; лечебная схема введения при изучении влияния на вирус парагриппа: 500 мкг для препарата Цитовир®-3 и 1000 мкг для препарата Умифеновир; профилактическая схема введения при изучении влияния на респираторно-синцитиальный вирус: 250 мкг для препарата Цитовир®-3 и 500 мкг для препарата Умифеновир; лечебная схема введения при изучении влияния на респираторно-синцитиальный вирус: 250 мкг для препарата Цитовир®-3 и 1000 мкг для препарата Умифеновир).

Одинаковый верхний потолок значений концентраций препарата Цитовир®-3, при которых было достигнуто 100% подавление вирусной активности (500 мкг для всех схем введения при изучении влияния на вирус парагриппа и 250 мкг для всех схем введения при изучении влияния на респираторно-синцитиальный вирус) также свидетельствует об избирательном (селективном) действии препарата Цитовир®-3 на оба изучаемых вируса *in vitro*. Однако необходимо уточнить, что подавляющее действие препарата Цитовир®-3 в отношении вируса парагриппа начинается на более низких концентрациях препарата при его заблаговременном (профилактическом) введении в культуру клеток.

## Выводы

1. При изучении противовирусной активности препарата Цитовир®-3 в отношении респираторно-синцитиального вируса показано, что препарат независимо от схемы применения (лечебной или профилактической) проявляет противовирусную активность в нетоксическом диапазоне концентраций, что свидетельствует о его высоком профиле безопасности.

2. Изучение действия препарата Цитовир®-3 в отношении вируса парагриппа показало, что препарат проявляет противовирусную активность как при лечебной, так и при профилактической схемах применения в нетоксическом диапазоне, что свидетельствует о его высоком профиле безопасности.

3. Полученные данные свидетельствуют о том, что подавляющее действие Цитовир®-3 в от-

ношении вируса парагриппа начинается при более низких концентрациях препарата при его профилактическом внесении в культуру клеток по сравнению с лечебной схемой применения.

4. Доказано что в отношении исследованных вирусов препарат Цитовир®-3 имеет более высокий индекс селективности, чем препарат сравнения Умифеновир.

5. Полученные результаты обосновывают возможность дальнейшего изучения противовирусной активности препарата Цитовир®-3 у больных респираторными вирусными инфекциями, обусловленными респираторно-синцитиальным вирусом и вирусом парагриппа.

## Дополнительная информация

**Участие авторов.** Зарубаев В. В. — дизайн и проведение исследования, редактирование публикации, статистическая обработка; Смирнов В. С. — дизайн исследования, редактирование публикации; Кудрявцева Т. А. — дизайн исследования, статистическая обработка, написание публикации; Петленко С. В. — дизайн исследования, редактирование публикации; Хоанг Мин — дизайн исследования, редактирование публикации; Слита А. В. — проведение исследования, редактирование публикации; Заплутанов В. А. — дизайн исследования, написание публикации.

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Additional information

**Contribution.** ZarubaeV. V. — research design and management, publication editing, statistical processing management; Smirnov V. S. — research design, publication editing; Kudryavtseva T. A. — research design and statistical processing management, publication writing; Petlenko S. V. — research design, publication editing; Slita A. V. — research management, publication editing; Hoang Minh — 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 Saint-Petersburg Pasteur Institute (Saint-Petersburg, Russian Federation) on the order and financial support of JSC «CYTOMED» (Saint-Petersburg, Russian Federation).

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

## Литература/References

1. Клинические рекомендации: Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) у взрослых. Available at: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/724\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/724_1) (accessed February 17, 2022). [Clinical guidelines: Acute respiratory viral infections (ARVI) in adults. Available at: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/724\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/724_1) (accessed February 17, 2022). (in Russian)]
2. Маркова Т.П., Чувиоров Д.Г. ОРВИ: профилактика и лечение в эпидемический сезон. Русский медицинский журнал. 2016; 3: 171–176. [Markova T.P., Chuvirov D.G. ORVI: profilaktika i lechenie v epidemicheskiy sezon. Russkii Meditsinskii Zhurnal. 2016; 3: 171–176. (in Russian)]
3. Клинические рекомендации: Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ). Available at: [https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/25\\_2](https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/25_2) (accessed February 17, 2022). [Clinical guidelines: Acute respiratory viral infections (ARVI). Available at: [https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/25\\_2](https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/25_2) (accessed February 17, 2022). (in Russian)]
4. Александрович Ю.С., Козлова Е.М., Новопольцева Е.Г., Новопольцев Д.Е. Острые респираторные инфекции у детей. Осложнения и жизнеугрожающие состояния: Учебное пособие для врачей. СПб.: СПбГПМУ; 2021. [Aleksandrovich Yu.S., Kozlova E.M., Novopol'tseva E.G., Novopol'tsev D.E. Ostrye respiratornye infektsii u detei. Oslozhneniya i zhizneugrozhayushchie sostoyaniya: Uchebnoe posobie dlya vrachei. SPb.: SPbGPMU; 2021. (in Russian)]
5. Бабченко И.В., Орлова Е.Д., Лобзин Ю.В. Влияние пандемии COVID-19 на сезонность респираторно-синцитиальной вирусной инфекции. Журнал инфектологии. 2022; 14 (2): 39–46. doi: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2022-14-2-39-46>. [Babchenko I.V., Orlova E.D., Lobzin Yu.V. Impact of the COVID-19 pandemic on the seasonality of respiratory syncytial viral infection. Zurnal Infektologii. 2022; 14 (2): 39–46. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2022-14-2-39-46>. (in Russian)]
6. Summeren van J., Meijer A., Aspelund G. et al. Low levels of respiratory syncytial virus activity in Europe during the 2020/21 season: what can we expect in the coming summer and autumn/winter? Eurosurveillance. 2021; 26 (29): 1–6. doi: [10.2807/1560-7917.ES.2021.26.29.2100639](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.29.2100639).
7. Foley D.A., Yeoh D.K., Minney-Smith C.A. et al. The interseasonal resurgence of respiratory syncytial virus in Australian children following the reduction of coronavirus disease 2019-related public health measures. Clin Infect Dis. 2021 Nov 2; 73 (9): e2829–e2830. doi: [10.1093/cid/ciaa1906](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1906).
8. Halabi K.C., Saiman L., Zachariah P. The Epidemiology of respiratory syncytial virus in New York City during the coronavirus disease-2019 pandemic compared with previous years. J Pediatr. 2022; 242: 242–244. doi: [10.1016/j.jpeds.2021.10.057](https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2021.10.057).
9. Julian D., Dorothy D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and molecular biology reviews. 2010; 74 (3): 417–433. doi: [10.1128/MMBR.00016-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10).
10. Liu Y., Wang H., Yang J., Zeng J., Sun G.M. Virome of respiratory secretion from children with unknown etiological acute respiratory disease revealed recombinant human parechovirus and other significant viruses. Virol J. 2021; 18 (1): 122. doi: [10.1186/s12985-021-01586-0](https://doi.org/10.1186/s12985-021-01586-0).
11. Клинические рекомендации: Грипп у взрослых. Available at: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/749\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/749_1) (accessed February 17, 2022). [Clinical guidelines: Influenza in adults. Available at: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/749\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/749_1) (accessed February 17, 2022). (in Russian)]
12. Головачева Е.Г., Афанасьева О.И., Гончарова Е.С., Быковская А.Г., Давлетгареева Д.В., Апрытина В.А. Возможности терапевтической коррекции патологии носоглотки, ассоциированной с COVID-19, у детей в амбулаторных условиях. Вестник оториноларингологии. 2021; 86 (6): 69–73. doi: <https://doi.org/10.17116/otorino20218606169>. [Golovacheva E.G., Afanasyeva O.I., Goncharova E.S., Bykovskaya A.G., Davletgareeva D.V., Apryatina V.A. Possibilities of therapeutic correction of ENT pathology associated with COVID-19 in children on an outpatient basis. Vestnik Oto-Rino-Laringologii. 2021; 86 (6): 69–73. doi: <https://doi.org/10.17116/otorino20218606169>. (in Russian, in English)]
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65 (1–2): 55–63. doi: [10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

## Информация об авторах

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

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

*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

*Слита Александр Валентинович* — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия. ORCID-ID: 0000-0001-8229-0715. Researcher ID: 9683-2017. Scopus Author ID: 7801335709

*Хоанг Мин* — научный сотрудник, Институт Пастера, Хошимин, Вьетнам. ORCID-ID: 0000-0002-3444-1360

*Заплутанов Василий Андреевич* — старший научный сотрудник лаборатории фармакологии пептидов, Автономная некоммерческая организация научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия. ORCID-ID: 0000-0001-5294-6533. Researcher ID: F-1215-2015. eLIBRARY SPIN-код: 6067-5480. Scopus Author ID: 553 12771400

## About the authors

*Vladimir V. Zarubaev* — D. Sc. in Biology, Head of the Laboratory of experimental virology researcher, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0002-5224-3771. Researcher ID: H-1534-2018. eLibrary SPIN code: 7030-1541. Scopus Author ID: 6602439930

*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

*Tatiana A. Kudryavtseva* — Ph. D. in Biology, Research scientist at the Laboratory of nanotechnology and synthesis of medicinal substances, Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0003-4997-9830

*Sergey V. Petlenko* — D. Sc. in Medicine, Leading researcher, 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.

*Alexander V. Slita* — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of experimental virology Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0001-8229-0715. Researcher ID: 9683-2017. Scopus Author ID: 7801335709

*Hoang Minh* — Researcher, Ho Chi Minh Pasteur Institute, Ho Chi Minh, Vietnam. ORCID-ID: 0000-0002-3444-1360

*Vasily A. Zaplutanov* — Senior Researcher of the Laboratory pharmacology of peptides, Institute of bioregulation and gerontology, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0001-5294-6533. Researcher ID: F-1215-2015. eLibrary SPIN code: 6067-5480. Scopus Author ID: 553 12771400

## Антибиотический потенциал морских актиномицетов родов *Streptomyces* и *Nocardioopsis*

\*О. Н. СИНЁВА, В. С. САДЫКОВА, О. П. БЫЧКОВА,  
Т. Д. ИВАНКОВА, К. В. МАЛЫШЕВА, Н. Н. МАРКЕЛОВА

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

## Antibiotic Potential of Marine Actinomycetes of the Genera *Streptomyces* and *Nocardioopsis*

\*OLGA N. SINEVA, VERA S. SADYKOVA, OLGA P. BYCHKOVA,  
TATIANA D. IVANKOVA, KSENIA V. MALYSHEVA, NATALIA N. MARKELOVA

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

### Резюме

В связи с появлением антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов актуальным является поиск продуцентов новых антимикробных метаболитов. Актиномицеты — грамположительные мицелиальные бактерии, являющиеся продуцентами большого количества антибиотиков, применяемых в медицине и агропромышленном комплексе. В настоящее время внимание исследователей нацелено на поиск актиномицетов в таких экологических нишах, как пресные и морские водоёмы, зоны с экстремальными природными условиями (вечномёрзлые почвы, ледники, пустынные, засоленные почвы и др.). В данном исследовании были восстановлены культуры морских актиномицетов после 15 лет хранения под вазелиновым маслом. Показано, что все штаммы сохранили жизнеспособность и антибиотическую активность на высоком уровне. На основании анализа последовательностей гена 16S рРНК установлена видовая принадлежность данных штаммов: *Streptomyces sampsonii* 6N, *Streptomyces sampsonii* 8N, *Streptomyces sampsonii* 521N, *Streptomyces halstedii* 22N, *Streptomyces brevishpora* 12N, *Streptomyces hirsutus* 23N, *Streptomyces niveus* 14N, *Nocardioopsis alba* 24N, *Nocardioopsis alba* 73N, *Nocardioopsis alba* 85N, *Nocardioopsis alba* 106N, *Nocardioopsis alborubida* 722N, *Nocardioopsis umidischolae* 755N, *Nocardioopsis umidischolae* 763N. Оценка антибиотической активности в отношении тест-организмов: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA — Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* КПБ F-37, *Fusarium solani* ВКПМ F-890, *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148, показала, что данные актиномицеты обладают широким спектром антибиотической активности и могут быть потенциальными продуцентами новых антибиотиков.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность; актиномицеты; антибиотическая активность; *Streptomyces*; *Nocardioopsis*

**Для цитирования:** Синёва О. Н., Садыкова В. С., Бычкова О. П., Иванкова Т. Д., Малышева К. В., Маркелова Н. Н. Антибиотический потенциал морских актиномицетов родов *Streptomyces* и *Nocardioopsis*. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 11–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-11-18>.

### Abstract

Due to the emergence of antibiotic resistance in pathogenic microorganisms, it is urgent to search for producers of new antimicrobial metabolites. Actinomycetes are gram-positive mycelial bacteria that produce a large number of antibiotics used in medicine and the agro-industrial complex. Currently, researchers are focused on the search for actinomycetes in ecological niches such as freshwater and marine reservoirs, zones with extreme natural conditions (permafrost soils, glaciers, desert, saline soils, etc.). In this study, cultures of marine actinomycetes were restored after 15 years of storage under vaseline oil. It was shown that all strains retained viability and antibiotic activity at a high level. Based on the results of 16S rRNA gene sequence analysis, the species were identified as: *Streptomyces sampsonii* 6N, *Streptomyces sampsonii* 8N, *Streptomyces sampsonii* 521N, *Streptomyces halstedii* 22N, *Streptomyces brevishpora* 12N, *Streptomyces hirsutus* 23N, *Streptomyces niveus* 14N, *Nocardioopsis alba* 24N, *Nocardioopsis alba* 73N, *Nocardioopsis alba* 85N, *Nocardioopsis alba* 106N, *Nocardioopsis alborubida* 722N, *Nocardioopsis umidischolae* 755N, *Nocardioopsis umidischolae* 763N. These strains of actinobacteria possessed significant antibiotic activity against the following pathogens: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA — *Staphylococcus aureus*), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247, *Saccharomyces cerevisiae* INA 01042, *Candida al-*

*bicans* ATCC 14053, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* CPB F-37, *Fusarium solani* VKPM F-890, *Fusarium oxysporum* VKPM F-148. Therefore, this study evaluated the marine actinomycetes can be potential producers of the novel antibiotics.

**Keywords:** antibiotic resistance; actinomycetes; antibiotic activity; *Streptomyces*; *Nocardioopsis*

**For citation:** Sineva O. N., Sadykova V. S., Bychkova O. P., Ivankova T. D., Malysheva K. V., Markelova N. N. Antibiotic potential of marine actinomycetes of the genera *Streptomyces* and *Nocardioopsis*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 11–18. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-11-18>.

## Введение

Одной из серьёзных проблем здравоохранения является возникновение антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов к используемым антибиотикам. Бесконтрольное и необоснованное применение противомикробных препаратов, в том числе в агропромышленном комплексе, привело к возникновению штаммов патогенов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. В настоящее время в ряде стран разработаны меры, направленные на ограничение использования антибиотиков в животноводстве, главным образом, это касается антибиотиков, применяемых одновременно в медицине и животноводстве [1–5]. С другой стороны, в сельском хозяйстве остро стоит проблема потери урожайности культур из-за фитопатогенов — грибов рода *Fusarium* и грамотрицательных бактерий рода *Pectobacterium*. Поиск и разработка биопрепаратов против фитопатогенов связана с тем, что применяемые в настоящее время химические фунгициды наносят серьёзный ущерб окружающей среде [6–11]. Таким образом поиск новых антибиотиков является одной из актуальных проблем современности.

В настоящее время актиномицеты по-прежнему остаются лидерами по количеству синтезируемых антибиотиков. Большинство актиномицетов было выделено из различных типов почв, однако в настоящее время в связи с поиском продуцентов новых метаболитов, интересы исследователей направлены на изучение актиномицетов, обитающих в других экологических нишах, в том числе пресных и морских водоёмах, где актиномицеты также являются неотъемлемой частью микробиомов [12–14].

## Материал и методы

Объектами исследования служили восстановленные после 15 лет хранения под вазелиновым маслом 14 штаммов актиномицетов, выделенные из морских отложений Тронхеймс фьорда в Норвегии. Хранение осуществлялось при комнатной температуре в пробирках на плотных питательных средах Гаузе 2 (модификация (г/л): триптон — 3,0; пептон — 5,0; глюкоза — 10,0; NaCl — 5,0; агар — 20,0) и овсяном агаре (овсяная мука — 20,0; агар 20,0). Высев актиномицетов проводился на плотные питательные среды Гаузе 2 и овсяный агар, время культивирования составляло 7–10 дней в термостате при температуре 28°C.

Для определения влияния солей на рост актиномицетов использовали овсяный агар с добавлением NaCl в концентрациях 10, 20 и 30 г/л.

Определение антибиотической активности проводили стандартными методами — методом перпендикулярного штриха и методом лунок.

Глубинное культивирование актиномицетов для выявления антибиотической активности проводили в шейкере-инкубаторе ThermoStable IS-20 (DAIHAN Scientific, Республика Корея) при температуре 28°C и скорости 180 об/мин., на средах (состав компонентов указан в г/л):

- 1) 11654 (соевая мука — 20,0; глюкоза — 30,0; NaCl — 3,0; CaCO<sub>3</sub> — 3,0);
- 2) A4 (соевая мука — 10,0; глюкоза — 10,0; NaCl — 5,0; CaCO<sub>3</sub> — 2,5);
- 3) 6613 (крахмал — 20,0; кукурузный экстракт 6,0; KNO<sub>3</sub> — 4,0; NaCl — 5,0; CaCO<sub>3</sub> — 5,0);
- 4) Сахарозная (сахароза — 20,0; соевая мука — 10,0; KNO<sub>3</sub> — 2,0; NaCl — 3,0; CaCO<sub>3</sub> — 3,0);
- 5) 2663 (глицерин — 30,0; соевая мука — 15,0; NaCl — 2,0; CaCO<sub>3</sub> — 5,0);
- 6) 330 (крахмал — 8,5; гороховая мука — 15,0; сахароза — 21; NaNO<sub>3</sub> — 5,0; CaCO<sub>3</sub> — 5,0; NaCl — 5,0);
- 7) 5339 (глицерин — 20,0; соевая мука — 5,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 1,5; NaCl — 3,0; CaCO<sub>3</sub> — 3,0).

Статистическую обработку данных (среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал) проводили в программе Excel 2016, доверительную вероятность принимали равной 0,95.

Антибиотическую активность определяли в отношении тест-организмов: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA — Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* КПБ F-37, *Fusarium solani* VKPM F-890, *Fusarium oxysporum* VKPM F-148.

Выделение ДНК из образцов чистых культур актиномицетов осуществляли с использованием коммерческого набора DNeasy Power Soil Kit (Quagen, США), согласно прилагаемой методике. Идентифицировали изоляты на основании анализа последовательности ДНК гена 16S рРНК (рибосомной РНК), полученной амплификацией целевого участка ДНК. Амплифицируемый фрагмент ДНК общей протяжённостью до 1500 нуклеотидов включал девять вариабельных регионов, разделённых консервативными участками. Фланкировали ген 16S рРНК универсальными прокариотическими праймерами: прямым — 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и обратным — 1492R 5'-GGTACCTGTACGACTT-3'. Реакцию ПЦР проводили с использованием готовой реакционной смеси BioMaster HS-Taq ПЦР-Спец (2×) (Биолабмикс, Россия), предназначенной для ДНК-матриц со сложной пространственной структурой или с GC-богатыми участками, в термодиклере (BioRad, США). Условия амплификации: предденатурация — 95°C, 5 мин; денатурация — 95°C, 15 с; отжиг — 52°C, 20 с; элонгация — 72°C, 1 мин — 30 циклов; финальный синтез — 72°C, 7 мин. По окончании ПЦР-амплификации наличие целевых продуктов подтверждали методом электрофореза в

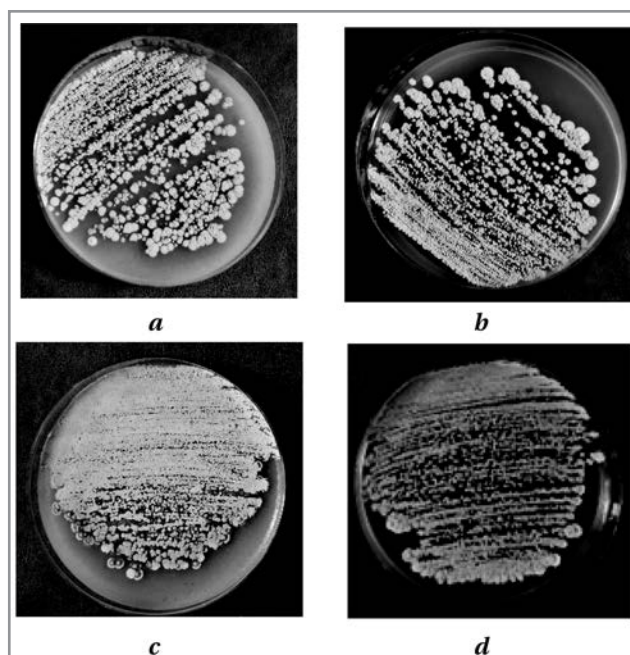
1,0% агарозном геле с бромистым этидием. Ампликоны из ПЦР-смеси очищали на колонках наборами Cleanup Standard (Евроген, Россия). Очищенные амплифицированные фрагменты ДНК использовали в реакции терминирующего секвенирования с применением флуоресцентно меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, США) в соответствии с протоколом производителя. Дополнительно реакцию секвенирования проводили с прямым праймером 341F 5'-X-ССТАУГГГРВГСАСАГ-3', отжиг которого приходится на участок V3 — один из варибельных регионов гена 16S рРНК. Секвенирование методом Сэнгера проводили на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems™, США). Полученные электрофореграммы находились в диапазоне от 400 до 600 п.н. Редактирование нуклеотидных прочтений и сохранение данных секвенирования осуществляли в программе Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, США). Сборку нуклеотидных последовательностей, прочитанных с трёх праймеров, и выравнивание их на референсные геномы (RefSeq; NCBI Reference Sequence Database) проводили при помощи программы SeqMan 7.1 (DNASTAR Inc.). Сохраняли информацию о собранных последовательностях в формате записи нуклеотидных последовательностей — FASTA и сравнивали полученные последовательности с уже существующими в базах данных NCBI [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi]. Данные в формате FASTA использовали для проведения филогенетического анализа методом PhyML Maximum Likelihood в программе UGENE.

## Результаты и обсуждение

В настоящее время широко применяются методы хранения культур микроорганизмов, такие как низкотемпературное замораживание и криоконсервация, тем не менее метод хранения под минеральным маслом по-прежнему используется на практике, однако сведений в литературе об эффективности данного хранения для актиномицетов крайне мало [15–17]. Вероятно, это связано с тем, что результаты возможно оценить только качественно (наличие обильного роста, морфологию колоний, пигментацию), но, как известно, многие актиномицеты обладают антибиотической активностью и её оценка до и после хранения может служить важным критерием для обоснования пригодности данного метода хранения для исследуемых культур.

В данном исследовании до закладки на хранение под вазелиновым маслом была определена антибиотическая активность культур в отношении тест-организмов методом перпендикулярных штрихов, описаны культурально-морфологические признаки и родовая принадлежность. Оценку жизнеспособности проводили после второго пересева в связи с наличием капель вазелинового масла на чашках, мешающих росту колоний. Результаты посева 14 культур актиномицетов после 15 лет хранения показали, что все штаммы сохранили высокую жизнеспособность, т. е. обладали активным ростом на среде Гаузе 2 и овсяном агаре. Примеры роста представлены на рис. 1.

В исследовании была установлена видовая принадлежность культур актиномицетов на осно-

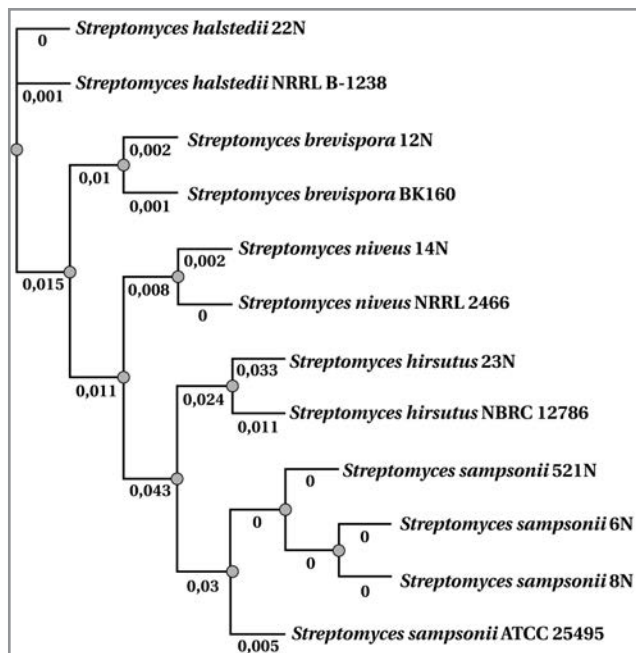


**Рис. 1.** Рост актиномицетов на плотных питательных средах после хранения под вазелиновым маслом: *Streptomyces sampsonii* 6N *a* — на овсяном агаре, *b* — на среде Гаузе 2; *Streptomyces halstedii* 22N: *c* — на овсяном агаре, *d* — на среде Гаузе 2.

**Fig. 1.** Growth of actinomycetes on dense nutrient media after storage under vaseline oil: *Streptomyces sampsonii* 6N *a* — on oat agar, *b* — on Gause 2 medium; *Streptomyces halstedii* 22N: *c* — on oat agar, *d* — on Gause 2 medium.

вания анализа последовательности ДНК гена 16S рРНК. Культуры актиномицетов были отнесены к следующим видам: *Streptomyces sampsonii* 6N, *Streptomyces sampsonii* 8N, *Streptomyces sampsonii* 521N, *Streptomyces halstedii* 22N, *Streptomyces brevispora* 12N, *Streptomyces hirsutus* 23N, *Streptomyces niveus* 14N, *Nocardioopsis alba* 24N, *Nocardioopsis alba* 73N, *Nocardioopsis alba* 85N, *Nocardioopsis alba* 106N, *Nocardioopsis alborubida* 722N, *Nocardioopsis umidischolae* 755N, *Nocardioopsis umidischolae* 763N, филогенетические деревья представлены на рис. 2, 3.

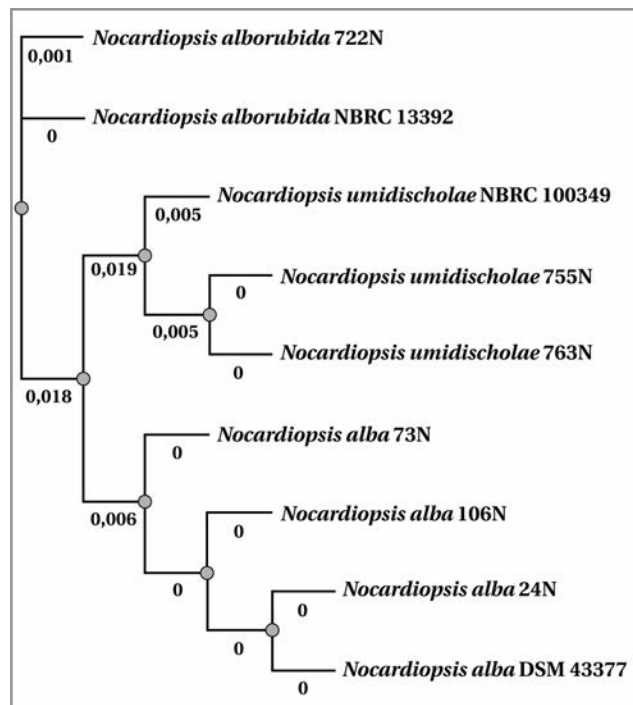
После восстановления роста культур актиномицетов была проведена оценка антибиотической активности методом перпендикулярных штрихов в отношении следующих тест-организмов: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053 (табл. 1). Полученные результаты показали, что штаммы сохранили антибиотическую активность на высоком уровне, кроме *Nocardioopsis* sp. 722N, *Nocardioopsis* sp. 755N, *Nocardioopsis* sp. 763N, у которых до хранения была меньшая активность в отношении *Micrococcus luteus* ATCC 9341, а после восстановления её не



**Рис. 2.** Кладограмма выделенных актиномицетов рода *Streptomyces*, построенная на основе вероятных изменений в нуклеотидных последовательностях.  
**Fig. 2.** A cladogram of isolated actinomycetes of the genus *Streptomyces* based on probable changes in nucleotide sequences.

удалось обнаружить данным методом.

Культивирование актиномицетов на жидких питательных средах показало, что штаммы *Streptomyces sampsonii* 6N, *Streptomyces sampsonii* 8N, *Streptomyces sampsonii* 521N, *Streptomyces halstedii* 22N, *Streptomyces hirsutus* 23N, *Nocardioiopsis alba* 24N, *Nocardioiopsis alba* 106N, *Nocardioiopsis umi-*



**Рис. 3.** Кладограмма выделенных актиномицетов рода *Nocardioiopsis*, построенная на основе вероятных изменений в нуклеотидных последовательностях.  
**Fig. 3.** A cladogram of isolated actinomycetes of the genus *Nocardioiopsis* based on probable changes in nucleotide sequences.

*discholae* 763N обладают высокой антифунгальной активностью. В зависимости от состава среды, зоны подавления роста тест-организмов отличались, в табл. 2 представлены результаты с указанием питательных сред, при культивирова-

**Таблица 1.** Антибиотическая активность культур актиномицетов до закладки на хранение и после 15 лет хранения.

**Table 1.** Antibiotic activity of actinomycete cultures before and after 15 years of storage.

№ штаммов актиномицетов	Зоны подавления роста тест-организмов, мм															
	<i>S.aureus</i> INA 00985		<i>S.aureus</i> INA 00761 (MRSA)		<i>M.luteus</i> ATCC 9341		<i>B.subtilis</i> ATCC 6633		<i>E.coli</i> ATCC 25922		<i>Paerugi-nosa</i> ATCC 27853		<i>S.cerevisiae</i> ИНА 01042		<i>C.albicans</i> ATCC 14053	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>S.sampsonii</i> 6N	3	3	3	3	6	5	6	7	H/a	H/a	H/a	H/a	15	14	11	12
<i>S.sampsonii</i> 8N	5	4	5	4	4	5	7	7	H/a	H/a	H/a	H/a	22	20	12	12
<i>S.sampsonii</i> 521N	3	3	4	3	3	H/a	3	3	H/a	H/a	H/a	H/a	15	14	12	13
<i>S.halstedii</i> 22N	H/a	H/a	H/a	H/a	5	3	20	25	H/a	H/a	H/a	H/a	23	24	H/a	H/a
<i>S.brevispora</i> 12N	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	3	3	H/a	H/a	H/a	H/a	17	15	H/a	H/a
<i>S.hirsutus</i> 23N	H/a	H/a	H/a	H/a	5	3	4	3	20	23	H/a	H/a	4	4	H/a	H/a
<i>S.niveus</i> 14N	3	3	2	H/a	4	3	9	10	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alba</i> 24N	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alba</i> 73N	H/a	H/a	H/a	H/a	10	12	5	5	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alba</i> 85N	H/a	H/a	H/a	H/a	14	15	5	5	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alba</i> 106N	H/a	H/a	H/a	H/a	15	15	5	4	H/a	H/a	H/a	H/a	25	>30	H/a	H/a
<i>N.alborubida</i> 722N	H/a	H/a	H/a	H/a	2	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a
<i>N.umidischolae</i> 755N	H/a	H/a	H/a	H/a	3	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a
<i>N.umidischolae</i> 763N	H/a	H/a	H/a	H/a	2	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a	H/a

**Примечание.** Столбец 1 — до закладки на хранение; столбец 2 — после 15 лет хранения; H/a — нет активности.

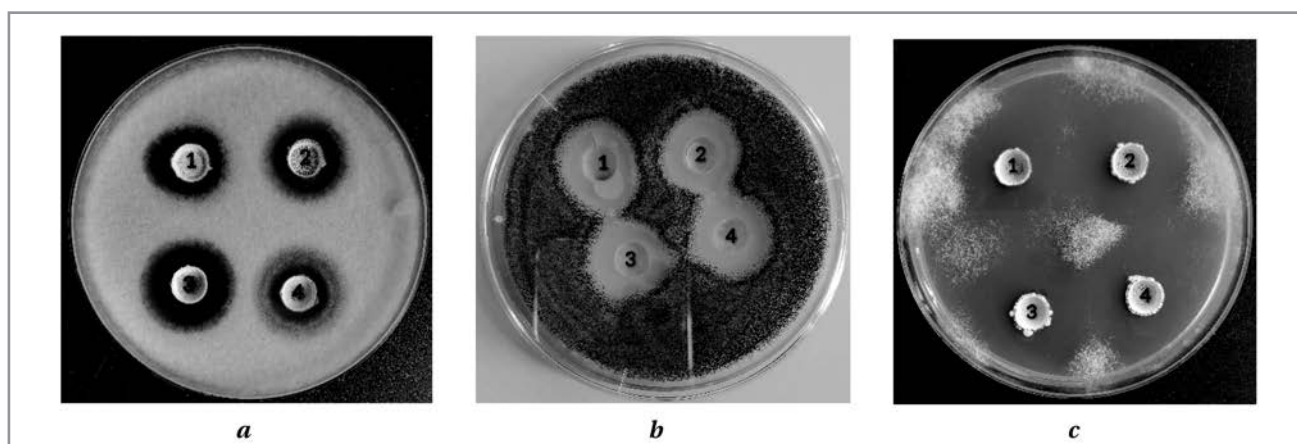
**Note.** Column 1 — before the bookmark for storage; column 2 — after 15 years of storage; H/a — no activity.

**Таблица 2.** Антифунгальная активность актиномицетов при глубинном культивировании на разных средах.  
**Table 2.** Antifungal activity of actinomycetes during deep cultivation on different media.

№ штамма	Среда	Зоны подавления роста тест-организмов, мм					
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F-148	<i>Fusarium solani</i> ВКПМ F-890	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Aspergillus fumigatus</i> КПБ F-3
<i>S.sampsonii</i> 6N	Гаузе 2	25,5±0,3	20,5±0,3	25,5±0,3	30,1±0,4	16,8±0,4	14,1±0,5
	A4	25,3±0,4	20,3±0,5	29,8±0,5	34,8±0,5	15±0,5	12±0,4
<i>S.sampsonii</i> 8N	Гаузе 2	35,1±0,5	19,4±0,5	34,8±0,5	40,6±0,4	16±0,5	12±0,4
	A4	29,8±0,5	18±0,4	40,6±0,4	15,2±0,4	18±0,4	12±0,4
<i>S.sampsonii</i> 521N	Гаузе 2	30,1±0,4	20,5±0,3	35,1±0,5	28,5±0,4	18±0,4	15±0,5
	A4	25,5±0,3	28,5±0,4	29,8±0,5	29,8±0,5	20,5±0,3	15,7±0,4
	6613	25,3±0,4	24±0,3	30,1±0,4	24±0,3	24±0,3	14,1±0,5
<i>N.alba</i> 106N	6613	25,3±0,4	30,1±0,4	18±0,4	12,5±0,3	20,5±0,3	12±0,4
	5339	25,5±0,3	30,7±0,3	20,6±0,4	15±0,8	14,3±0,4	14,3±0,4
<i>N.alba</i> 24N	11654	15±0,8	14,3±0,4	24±0,3	14,5±0,5	18±0,4	11,5±0,3
	5339	14,3±0,4	14,5±0,5	15±0,8	15,7±0,4	16±0,5	11,3±0,3
<i>S.halstedii</i> 22N	Гаузе 2	20,4±0,3	14,3±0,4	20,4±0,3	20,4±0,3	11,5±0,3	11,3±0,3
	A4	20,4±0,3	15±0,5	14,5±0,5	15±0,5	12,5±0,3	11,5±0,3
<i>S.hirsutus</i> 23N	11654	12,5±0,3	12,5±0,3	15±0,5	14,5±0,5	H/a	H/a
	A4	13±0,4	12,5±0,3	15,2±0,4	15±0,5	H/a	H/a
<i>N.umidischolae</i> 763N	A4	13±0,4	н/а	20,4±0,3	20,4±0,3	H/a	H/a

**Примечание.** Здесь и в табл. 3: H/a — нет активности.

**Note.** Here and Table 3: H/a — no activity.



**Рис. 4.** Антифунгальная активность актиномицетов при глубинном культивировании на средах разного состава.  
**a** — тест-культура *Fusarium solani* ВКПМ F-890, среда культивирования A4, штаммы: 1 — *S.hirsutus* 23N; 2 — *N.alba* 106N; 3 — *N.umidischolae* 763N; 4 — *S.halstedii* 22N.

**b** — тест-культура *Aspergillus niger* ATCC 16404, среда культивирования 11654, штаммы: 1 — *S.sampsonii* 6N; 2 — *N.alba* 24N; 3 — *S.sampsonii* 8N; 4 — *S.sampsonii* 571N.

**c** — тест-культура *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148, среда культивирования 5339, штаммы 1 — *N.alba* 24N; 2 — *S.sampsonii* 6N; 3 — *S.sampsonii* 571N; 4 — *S.sampsonii* 8N.

**Fig. 4.** Antifungal activity of actinomycetes during deep cultivation on media of different composition.

**a** — test culture *Fusarium solani* VKPM F-890, cultivation medium A4, strains: 1 — *S.hirsutus* 23N; 2 — *N.alba* 106N; 3 — *N.umidischolae* 763N; 4 — *S.halstedii* 22N.

**b** — test culture *Aspergillus niger* ATCC 16404, cultivation medium 11654, strains: 1 — *S.sampsonii* 6N; 2 — *N.alba* 24N; 3 — *S.sampsonii* 8N; 4 — *S.sampsonii* 571N.

**c** — test culture of *Fusarium oxysporum* VKPM F-148, culture medium 5339, strains: 1 — *N.alba* 24N; 2 — *S.sampsonii* 6N; 3 — *S.sampsonii* 571N; 4 — *S.sampsonii* 8N.

нии на которых актиномицеты проявляли наибольшую антифунгальную активность, на рис. 4 показаны зоны ингибирования роста *Aspergillus niger* ATCC 16404 и фитопатогенных грибов *Fusarium solani* ВКПМ F-890, *Fusarium oxysporum*

ВКПМ F-148 при культивировании актиномицетов на различных питательных средах.

Ранее исследователями была показана антифунгальная активность для вида *S.sampsonii*, выделенного из агролесомелиоративной почвы,



**Таблица 3. Антибиотическая активность актиномицетов в отношении грамположительных тест-организмов при глубинном культивировании.**

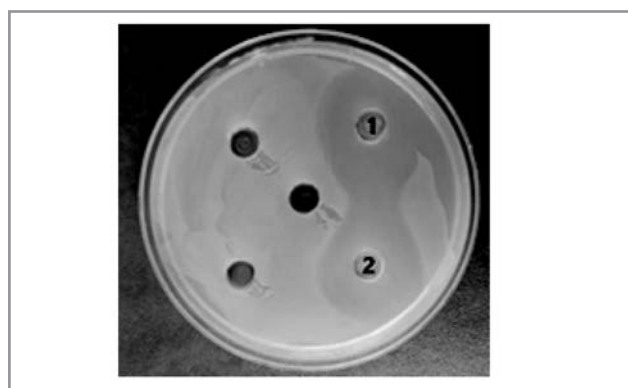
**Table 3. Antibiotic activity of actinomycetes against gram-positive test organisms during deep cultivation.**

№ штамма	Среда	Зоны подавления роста тест-организмов, мм			
		<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
<i>S.sampsonii</i> 6N	A4	10,2±0,3	H/a	12,1±0,4	14,1±0,4
<i>S.sampsonii</i> 8N	11654	10,3±0,3	H/a	13,8±0,3	15±0,4
	A4	10,3±0,3	H/a	13±0,4	15,2±0,4
<i>S.sampsonii</i> 521N	Гаузе 2	H/a	H/a	22,1±0,4	12,1±0,4
<i>S.brevispora</i> 12N	сахарозная	13,7±0,3	14±0,4	14,1±0,4	14,1±0,4
<i>S.halstedii</i> 22N	Гаузе 2	12,1±0,4	н/а	16,1±0,4	18,2±0,3
	сахарозная	12,3±0,3	12,3±0,3	14,1±0,4	15,2±0,4
<i>N.alba</i> 24N	11654	17,2±0,3	H/a	15±0,4	15±0,4
<i>N.alba</i> 73N	Гаузе 2	H/a	H/a	14,3±0,3	13,5±0,3
<i>N.alba</i> 85N	Гаузе 2	H/a	H/a	14±0,4	14±0,4
<i>N.alba</i> 106N	6613	25,1±0,4	H/a	20,4±0,4	18,2±0,3

в отношении фитопатогенных грибов — *Foxysporium*, *Sclerotinium rolfii*, и *Rizhoctonia solani* за счёт образования антибиотиков группы полиенов [18]. Для штамма *S.sampsonii* (MN700191 «DG1») проявление антифунгального эффекта в отношении фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* было обусловлено наличием ароматических соединений (фенола, аценафтена, 1,4-бензолдиола и производных фталата) в культуральной жидкости [19].

В отношении грамположительных бактерий *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA) выделенные культуры не обладали высокой антибиотической активностью, наилучшие результаты представлены в табл. 3. Было отмечено появление зон ингибирования роста *Micrococcus luteus* ATCC 9341 диаметром 11–12 мм у штаммов *Nocardioopsis alborubida* 722N, *Nocardioopsis umidischolae* 755N, *Nocardioopsis umidischolae* 763N, которые не удалось обнаружить методом штрихов, сделанным сразу после восстановления штаммов, таким образом, можно сделать вывод, что данные культуры не утратили антибиотическую активность после хранения, но им требовалось больше времени для восстановления. Антибактериальная активность в отношении грамположительных тест-бактерий *Micrococcus luteus* ATCC 14452 ранее была показана для галотолерантного штамма вида *N.alba* [20].

Небольшие зоны ингибирования роста (15–16 мм) грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 выявлены у штаммов актиномицетов *N.alba* 24N, *N.alba* 106N, *S.hirsutus* 23N при культивировании на средах 11654, 6613, Гаузе 2, соответственно. В отношении фитопатогенной бактерии *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247 бактериостатическую активность (диаметр зоны



**Рис. 5. Зоны подавления *Pectobacterium carotovorum* KM-B1247 культурами актиномицетов.**

1 — *Nocardioopsis alba* 24N; 2 — *Streptomyces hirsutus* 23N при культивировании на среде Гаузе 2.

**Fig. 5. Suppression zones of *Pectobacterium carotovorum* VKM-B1247 by actinomycete cultures.**

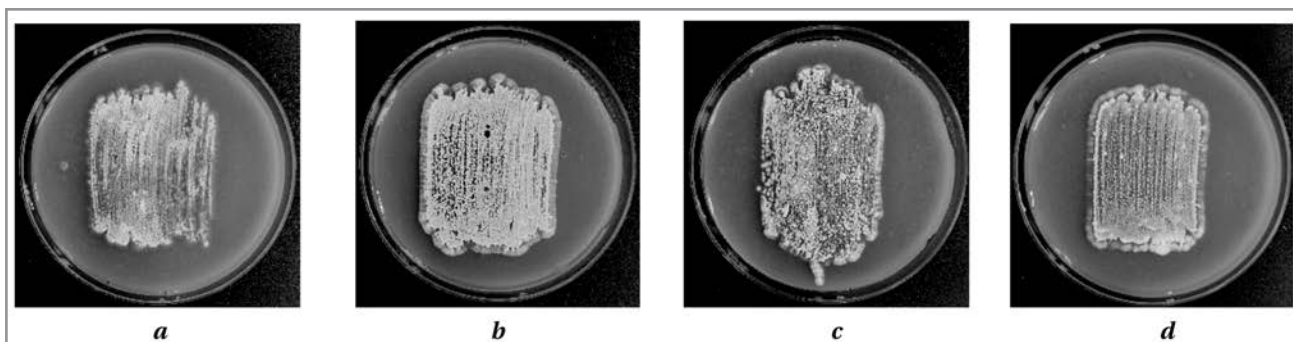
1 — *Nocardioopsis alba* 24N; 2 — *Streptomyces hirsutus* 23N when cultured on Gause medium 2.

подавления роста — 25–30 мм) проявляли культуры *N.alba* 24N и *S.hirsutus* 23N (рис. 5).

Изучение роста актиномицетов на овсяном агаре с содержанием NaCl в концентрациях 10, 20, 30 г/л показало, что все штаммы обладали активным ростом при всех указанных вариантах концентраций солей (рис. 6).

## Заключение

Проведённое исследование показало, что культуры морских актиномицетов родов *Streptomyces* и *Nocardioopsis* полностью сохранили жизнеспособность и антибиотическую активность после 15 лет хранения под вазелиновым маслом. Таким образом, данный метод может быть рекомендован для длительного хранения культур актиномицетов.



**Рис. 6.** Рост *Nocardioopsis alba* 73N на овсяном агаре при разных концентрациях солей. *a* — контроль; *b* — 10 г/л NaCl; *c* — 20 г/л NaCl; *d* — 30 г/л NaCl.

**Fig. 6.** Growth of *Nocardioopsis alba* 73N on oat agar at different salt concentrations. *a* — control; *b* — 10 g/l NaCl; *c* — 20 g/l NaCl; *d* — 30 g/l NaCl.

Установлено, что выделенные штаммы являются галотолерантными и обладают широким спектром антибиотической активности, в том числе в отношении фитопатогенов, и целесообразным является их дальнейшее изучение в качестве продуцентов новых антибиотиков.

## Литература/References

- Berdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot* (Tokyo). 2012; 65 (8): 385–395. doi: 10.1038/ja.2012.27.
- Ventola C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*. 2015; 40 (4): 277–283.
- Орлова Н.В. Антибиотикорезистентность и современная стратегия антибактериальной терапии. *Медицинский совет*. 2022; 16 (8): 89–97. doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-8-89-97>. [Orlova N.V. Antibiotikorezistentnost' i sovremennaya strategiya antibakterial'noi terapii. *Meditsinskii Sovet*. 2022; 16 (8): 89–97. doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-8-89-97>. (in Russian)]
- Мурленков Н.В. Проблемы и факторы развития антибиотикорезистентности в сельском хозяйстве. *Биология в сельском хозяйстве*. 2019; 4: 11–14. [Murlenkov N.V. Problemy i faktory razvitiya antibiotikorezistentnosti v sel'skom khozyaistve. *Biologiya v Sel'skom Khozyaistve*. 2019; 4: 11–14. (in Russian)]
- Sarkar D. J., Mukherjee I., Shakil N.A., Rana V.S., Kaushik P., Debnath S. Antibiotics in Agriculture: Use and Impact. *Indian Journal of Ethnopharmacology*. 2018; 4 (1): 4–19.
- Munkvold G. Fusarium species and their associated mycotoxins. *Methods Mol Biol*. 2017; 1542: 51–106. doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0\_4.
- Meng X., Chai A., Shi Y., Xie X., Ma Z., Li B. Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasilense* in China. *Plant Dis*. 2017; 101 (2): 279–287. doi: 10.1094/PDIS-05-16-0763-RE.
- Waleron M., Misztak A., Waleron M., Franczuk M., Wielgomas B., Waleron K. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruviansense* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2018; 41 (2): 85–93. doi: 10.1016/j.syapm.2017.11.005.
- Широких И.Г., Назарова Я.И., Бакулина А.В., Абубакирова Р.И. Новые штаммы стрептомицетов как перспективные биофунгициды. *Теоретическая и прикладная экология*. 2021; 1: 172–180. doi: <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-1-172-180>. [Shirokikh I.G., Nazarova Ya.I., Bakulina A.V., Abubakirova R.I. Novyye shtammy streptomitsvetov kak perspektivnyye biofungitsidy. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2021; 1: 172–180. doi: <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-1-172-180>. (in Russian)]
- Ulloa-Ogaza A.L., Munoz-Castellanos L.N., Nevarez-Moorillon G.V. Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control. In book: *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*. 2015: 305–309.
- Pasanen M., Laurila J., Brader G., Palva E.T., Ahola V., van der Wolf J., A. Hannukkala A., Pirhonen M. Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolates from dis-

**Дополнительная информация**  
**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Additional information**  
**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest related to the publication of this article.

- eased potato plants in Finland. *Annals of Applied Biology* I. 2016; 163 (3): 403–419. doi: <https://doi.org/10.1111/aab.12076>
- Selim M. S. M., Abdelhamid S. A., Mohamed S. S. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Gen Eng Biotechnol*. 2021; 19 (1): 1–13. doi: 10.1186/s43141-021-00156-9.
- Орлова Т.И., Булгакова В. Г., Полин А. Н. Вторичные метаболиты морских микроорганизмов. I Вторичные метаболиты морских актиномицетов. *Антибиотики и химиотер*. 2015; 60 (7–8): 47–59. [Orlova T.I., Bulgakova V.G., Polin A.N. Secondary metabolites from marine microorganisms. I. Secondary metabolites from marine actinomycetes. *Antibiotici i Khimioter*. 2015; 60 (7–8): 47–59 (in Russian)]
- Elnahas M.O., Elkhateeb W.A., Daba G.M. Marine actinomycetes the past, the present and the future. *Open Access Journal of Pharmaceutical Research*. 2021; 5 (2): 1–7. doi: 10.23880/oajpr-16000241
- Синёва О.Н., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П. Низкотемпературное хранение актиномицетов — представителей рода *Streptomyces*. *Антибиотики и химиотер*. 2019; 64 (3–4): 3–8. doi: <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10011>. [Sineva O.N., Ivankova T.D., Terekhova L. P. Low temperature storage of actinomycetes — members of genus *Streptomyces*. *Antibiotici i Khimioter*. 2019; 64 (3–4): 3–8. doi: <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-10011>. (in Russian)]
- Выборнова Т.В., Шарова Н. Ю., Принцева А. А. Возможности криоконсервирования коллекционных штаммов актиномицетов *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* — продуцентов ингибиторов гликозидаз. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019; 9 (4): 643–653. doi: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-643-653>. [Vybornova T.V., Sharova N.Yu., Printseva A.A. Cryopreservation potential of *Streptomyces lucensis* and *Streptomyces violaceus* actinomycete collection strains as producers of glycosidase inhibitors. *Proceedings of universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019; 9 (4): 643–653. doi: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-643-653>. (in Russian)]
- Бекмухамедова Н. К., Мавзжудова А. М., Куканова С. И., Зайнитдинова Л. И., Мамиев М. С. Сохранность антагонистических свойств актиномицетов при хранении различными методами. *Universum: химия и биология: электронный научный журнал*. 2021; 2 (80). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/11236> (дата обращения: 05.02.2021). [Bekmukhamedova N.K., Mavzhudova A.M., Kukanova S.I., Zainitdinova L.I., Mamiev M.S. Preservation of the antagonistic properties of actinomycetes when stored by various methods. *Universum: khimiya i biologiya: elektronnyj nauchnyj zhurnal*. 2021; 2 (80). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/11236> (data obrashcheniya: 05.02.2021). (in Russian)]
- Radhakrishnan S., Varadharajan M. Isolation, identification, and screening of polyene antifungal compound producing *Streptomyces sampsonii* MDCE7 from agroforestry soil. In Dharumadurai D. editor. *Methods in*

actinobacteriology. Springer protocols handbooks. 2022; 379–389. doi: 10.1007/978-1-0716-1728-1\_46).

19. *Ghanem G.A.M., Gebily D.A.S., Ragab M.M. et al.* Efficacy of antifungal substances of three *Streptomyces* spp. against different plant pathogenic fungi. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 2022; 32: 112 doi: 10.1186/s41938-022-00612-9.

20. *Sarmiento-Vizcaino A., Martín J., Reyes F., García L.A., Blanco G.* Bioactive natural products in *Actinobacteria* isolated in rainwater from storm clouds transported by western winds in Spain. Front Microbiol. 2021; 12: 773095. doi: 10.3389/fmicb.2021.773095.

## Информация об авторах

*Синёва Ольга Николаевна* — к. б. н., научный сотрудник лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-0063-4922

*Садыхова Вера Сергеевна* — д. б. н., заведующая лабораторией таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9372-5948

*Бычкова Ольга Петровна* — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории разработки методов поиска биологически активных соединений Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-4107-3794

*Иванкова Татьяна Дмитриевна* — научный сотрудник лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. Scopus Author ID: 56069625600

*Мальшиева Ксения Владимировна* — лаборант лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия

*Маркелова Наталья Николаевна* — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории биосинтеза антибиотиков Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-0759-721X

## About the authors

*Olga N. Sineva* — Ph. D. in Biology, Researcher at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-0063-4922

*Vera S. Sadykova* — D. Sc. in Biology, Head of at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9372-5948

*Olga P. Bychkova* — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Department for the Development of Methods for Discovering Biologically Active Compounds, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-4107-3794

*Tatiana D. Ivankova* — Researcher at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. Scopus Author ID: 56069625600

*Ksenia V. Malysheva* — Laboratory assistant at the Department of Taxonomic Research and Culture Collection of Microorganisms, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

*Natalia N. Markelova* — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory biosynthesis of antibiotic, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-0759-721X

## Антибактериальная активность галоген- и нитропроизводных бензимидазола в отношении *Bacillus subtilis*

\*Р. С. БЕГУНОВ, Д. О. ЕГОРОВ, А. В. ЧЕТВЕРТАКОВА, Л. И. САВИНА, А. А. ЗУБИШИНА

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, Ярославль, Россия

## Antibacterial Activity of the Halogen- and Nitro Derivatives of Benzimidazole Against *Bacillus Subtilis*

\*ROMAN S. BEGUNOV, DMITRIY O. EGOROV,  
ANNA V. CHETVERTAKOVA, LUIZA I. SAVINA, ALLA A. ZUBISHINA

P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

### Резюме

**Актуальность.** Антибиотикорезистентность бактерий является серьёзной проблемой для современной медицины. Вследствие этого поиск новых соединений, обладающих выраженным антибактериальным эффектом, является актуальной задачей фармацевтической химии и смежных с ней наук. **Цель.** Оценка влияния структуры бензимидазола и его производных на их способность ингибировать рост грамположительных бактерий *Bacillus subtilis*. **Материал и методы.** Антибактериальную активность диазгетероциклов оценивали методом серийных разведений в концентрации 0,06–1000 мкг/мл. В процессе исследования была определена минимальная подавляющая концентрация (МПК) производных бензимидазола в отношении *B. subtilis* ВКМ В-407. В качестве тестируемых соединений использовали галоген- и нитробензимидазолы, антибактериальный эффект которых сравнивали с антимикробной активностью бензимидазола. **Результаты.** Установлено противомикробное действие 12 производных бензимидазола. Наиболее выраженный ингибирующий эффект имели 2-трифторметилбензимидазолы, содержащие в фениленовом фрагменте атомы галогенов. Дигалогенпроизводные обладали большей антибактериальной активностью, чем соединения с одним атомом галогена в бензольном кольце. МПК наиболее активного вещества — 5,6-дибром-2-(трифторметил)бензимидазола составила 0,49 мкг/мл, что сопоставимо с действием коммерческого антибиотика тетрациклина. Эритромицин был в два раза менее эффективен по сравнению с данным веществом. **Заключение.** Полигалогенпроизводные бензимидазола являются перспективными соединениями для разработки новых антибактериальных препаратов в отношении грамположительных бактерий.

**Ключевые слова:** полифункциональные производные бензимидазола; антибактериальная активность; минимальная подавляющая концентрация; грамположительные бактерии; *Bacillus subtilis*

**Для цитирования:** Бегунов Р. С., Егоров Д. О., Четвертакова А. В., Савина Л. И., Зубишина А. А. Антибактериальная активность галоген- и нитропроизводных бензимидазола в отношении *Bacillus subtilis*. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68: 3–4: 19–24. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-19-24>.

### Abstract

**Background.** Antibiotic resistance of bacteria is a serious concern for modern medicine. The search for new compounds with a pronounced antibacterial effect is an urgent task of pharmaceutical chemistry. **The aim of the study** was to assess influence of the structure of benzimidazole and its derivatives the ability to inhibit the growth of gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*. **Materials and methods.** Antibacterial activity of diazaheterocycles was evaluated by the method of serial dilutions. Concentrations from 0,06 to 1000 µg/l were used. The minimum inhibitory concentration (MIC) of benzimidazole derivatives against *Bacillus subtilis* BKM B-407 was determined. The antibacterial effect of the studied halogen- and nitrobenzimidazoles was compared with the antimicrobial activity of benzimidazole. **Results.** The antimicrobial activity of the 12 benzimidazole derivatives was established. 2-trifluoromethylbenzimidazoles containing halogen atoms in the phenylene fragment had the most pronounced inhibitory effect. The dihalogenated derivatives exhibited greater antibacterial activity than the compounds with one halogen atom in the benzene ring. 5,6-dibromo-2-(trifluoromethyl)benzimidazole was the most active compound with an MIC of 0.49 µg/mL, comparable to the commercial antibiotic tetracycline. The antibacterial activity of erythromycin is a half that of this substance. **Conclusions.** Polyhalogen derivatives of benzimidazole are promising compounds for the development of new antimicrobial drugs against Gram-positive bacteria.

**Keywords:** polyfunctional derivatives of benzimidazole; antibacterial activity; minimum inhibitory concentration; gram-positive bacteria; *Bacillus subtilis*

**For citation:** Begunov R. S., Egorov D. O., Chetvertakova A. V., Savina L. I., Zubishina A. A. Antibacterial activity of the halogen- and nitro derivatives of benzimidazole against *Bacillus Subtilis*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68: 3–4: 19–24. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-19-24>.

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: ул. Советская, д.14, Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, г. Ярославль, Россия, 150003. E-mail: begunov@bio.uniyar.ac.ru

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 14, Sovetskaya str., P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150003 Russia. E-mail: begunov@bio.uniyar.ac.ru

## Введение

Перспективным классом органических соединений для разработки новых антибиотиков являются производные бензимидазола [1]. К действию бензимидазолов чувствительны такие патогены как метициллинорезистентный *Staphylococcus aureus* и ванкомицинорезистентные энтерококки [2–5]. Бензимидазолы могут быть использованы в комплексе с другими антибиотиками, что может значительно увеличить эффективность лечения [6]. Помимо этого, производные бензимидазола способны воздействовать непосредственно на вирулентные свойства бактерии, не вызывая явлений, связанных с антибиотикорезистентностью [7]. К тому же данные соединения обладают низкой токсичностью в отношении животных [1].

Проведённые нами ранее исследования показали, что эти гетероциклы достаточно эффективны против грамотрицательных бактерий [8]. Степень ингибирования роста бактерий определялась структурой бензимидазолов, т. е. наличием тех или иных заместителей в гетероциклическом ядре. В продолжение этих исследований было изучено влияние структуры бензимидазолов на их способность ингибировать рост грамположительной бактерии *Bacillus subtilis*. Особое внимание было уделено галогенпроизводным, т.к. известно, что наличие в бензимидазоле атомов галогенов усиливает биологическую, и в частности антимикробную, активность [9, 10].

В качестве тест-объекта был использован представитель рода *Bacillus* — *Bacillus subtilis* ВКМ В-407. Широко распространено мнение о том, что *B. subtilis* является непатогенной бактерией, которая используется в пищевой, сельскохозяйственной, фармацевтической и медицинской промышленности [11]. Отчасти, это действительно так. Однако в последнее время всё чаще появляется информация о проявлении некоторыми штаммами этого вида патогенности [12]. Исследователи указывают на обнаружение токсигенных культур *B. subtilis* в продуктах питания, таких как молоко и молочные продукты [13, 14]. Имеются данные, что выделенный из пищевых продуктов штамм *B. subtilis*, проявлял токсичность в отношении клеток животных и показал ингибирующий эффект в тесте на сперматозоидах хряков. В качестве фактора вирулентности был определён термостабильный токсин амилозин [15]. В работе Т. Е. Zhu и др. [16] показано, что коинфицирование *B. subtilis* и *Riemerella anatipestifer* приводило к повреждению печени и нарушению гематоэнцефалического барьера у 9-дневных утят, что вело к их смерти в 100% случаев. Помимо этого, доказано, что *B. subtilis* способен уклоняться от иммунной защиты рыб и мышей, опосредованной комплементом и фагоцитами [17].

К тому же среди бацилл существует множество резистентоваров по отношению к различным антибиотикам. Были обнаружены антибиотикорезистентные штаммы *B. subtilis*, выделенные из почвы, с поверхностей оборудования в медучреждениях, из ветеринарных и сельскохозяйственных пробиотических препаратов. Штаммы *B. subtilis* были устойчивы к действию хлорамфеникола, тетрациклина, гентамицина, амоксициллина, цефтриаксона, рифампицина, ампициллина, стрептомицина, спектиномицина, бета-лактамных антибиотиков, таким как меропенем, ряда производных цефалоспоринов I (цефазолин), II (цефуроксим), III (цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим) и IV (цефепим) поколений [18–22]. Повышенная антибиотикорезистентность штаммов бацилл в природных и антропогенных изолятах подчёркивает важность поиска новых антибактериальных препаратов.

В связи с вышеизложенным были проведены исследования по выбору перспективных соединений, которые могут быть использованы для разработки новых антибиотиков.

*Цель работы* — изучить влияние структуры производных бензимидазола на рост грамположительных бактерий *B. subtilis* ВКМ В-407.

## Материал и методы

**Бензимидазол и его производные.** Для исследований использовались бензимидазол, его 2-алкильные производные и содержащие атомы галогенов или нитрогруппы бензимидазолы.

Синтез соединений 1, 2 и 4 проводили кипячением бензол-1,2-диамина в муравьиной (получение 1-Н-бензимидазола (1)), уксусной в присутствии HCl (получение 2-метил-1-Н-бензимидазола (2)), трифторуксусной (получение 2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазола (4)) кислот. 2-Бензил-1-Н-бензимидазол (4) был выделен экстракцией ацетоном из коммерческого препарата дибазол. Введение нитрогрупп и атомов галогенов в 2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазол (4) осуществляли в ходе реакции ароматического электрофильного замещения в серной кислоте с нитрующей смесью  $\text{KNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  (получение 5-нитро-2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазола (5) и 5,6-динитро-2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазола (6)), с бромсукцинимидом (получение 5-бром-2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазола (8) и 5,6-дибром-2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазола (10)), с хлорсукцинимидом (получение 5-хлор-2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазола (9) и 5,6-дихлор-2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазола (11)). 5-Хлор-2-(трифторметил)-6-морфолин-4-ил-1-Н-бензимидазол (12) был получен замещением атома хлора в дигалогенпроизводном 10. Синтез N-арилзамещённых бензимидазолов 7 и 13 осуществляли при 110°C в реакции  $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$  2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазола (4) с 2,4-динитрохлорбензолом и 5,6-дихлор-2-(трифторметил)-1-Н-бензимидазола (11) с 2-нитро-4-(трифторметил)хлорбензолом, соответственно.

**Штаммы и условия культивирования.** Биологическую активность *in vitro* оценивали в отношении грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* ВКМ В-407. Штамм *B. subtilis* ВКМ В-407 выращивали на жидкой среде LB по Miller («Диам», Россия) при 28°C.

**Исследование антибактериальной активности.** Противомикробную активность бензимидазолов оценивали с использованием метода серийных разведений [23] в отношении

планктонных форм *Bacillus subtilis* ВКМ В-407. Тестирование проводили в стерильных 96-луночных планшетах для иммунологических исследований в объёме 200 мкл с конечной концентрацией исследуемого микроорганизма примерно  $10^6$  КОЕ/мл. Раствор соединения готовили в ДМСО, конечная концентрация которого в среде не превышала 0,05%. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) была определена как концентрация тестируемого соединения, полностью подавляющая рост бактерий после 24 ч инкубации при 28°C. В качестве стандартного препарата сравнения использовали активные в отношении грамположительных микроорганизмов антибиотики тетрациклин-ЛекТ (ОАО «Тюменский химико-фармацевтический завод») и эритромицин (ОАО «Тюменский химико-фармацевтический завод»).

Плотность бактериальной суспензии определяли путём измерения оптической плотности при длине волны 595 нм с использованием планшетного фотометра iMark (Bio-Rad). Эксперименты проводились в 5-кратной повторности для каждого разведения потенциального антибактериального препарата. Все эксперименты проводились в 3 повторностях. В качестве контроля использовали суспензию бактерии в той же концентрации, что и для эксперимента, без добавления изучаемого вещества. Для оценки результата каждого опыта была сделана поправка на оптическую плотность исследуемых соединений.

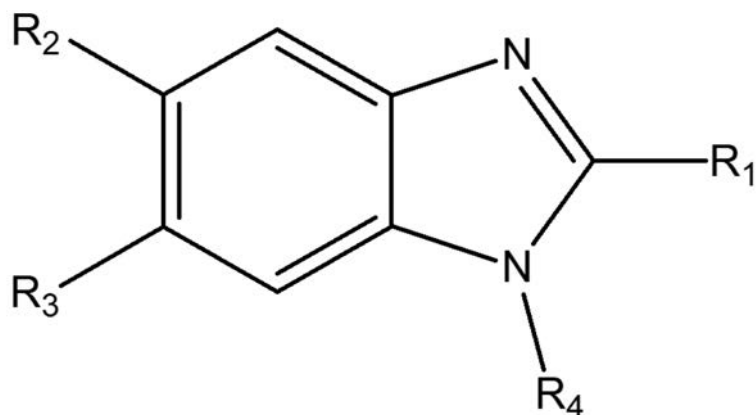
**Математическая обработка данных.** Статистическая обработка полученных в ходе эксперимента данных включала вычисление описательных статистик (среднее арифметическое, стандартная ошибка среднего). Для обнаружения статистически значимых различий между средними значениями признака в двух независимых выборках применялся непар-

аметрический критерий Манна-Уитни. В качестве критического уровня значимости было принято значение  $p \leq 0,05$ . Статистический анализ данных проводился при помощи программ Statistica (StatSoft Inc., США) и Microsoft Office Excel (Microsoft Corp., США).

## Результаты и обсуждение

В ходе исследований использовали бензимидазолы, содержащие усиливающие бактерицидные свойства атомы галогенов и/или нитрогруппу часто встречающиеся в соединениях обладающих сильными бактерицидными свойствами [23, 24]. Для оценки влияния структуры гетероциклов на антимикробную активность применяли незамещённый бензимидазол и его 2-алкильные производные. Известно, что некоторые 2-метилбензимидазолы проявляли высокую антибактериальную активность в отношении различных грамположительных бактерий, таких как *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Streptococcus mutans* [25]. Антимикробную активность исследуемых соединений оценивали в концентрации 0,06–1000 мкг/мл. Способность бензимидазолов ингибировать рост *Bacillus subtilis* ВКМ В-407 приведена в таблице.

### Антибактериальная активность бензимидазола (1) и его производных (2–13) Antibacterial activity of benzimidazole(1) and its derivatives (2–13)



- 1)  $R_1=R_2=R_3=R_4=H$ ;
- 2)  $R_1=CH_3$ ,  $R_2=R_3=R_4=H$ ;
- 3)  $R_1=CH_2Ph$ ,  $R_2=R_3=R_4=H$ ;
- 4)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=R_3=R_4=H$ ;
- 5)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=NO_2$ ,  $R_3=R_4=H$ ;
- 6)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=R_3=NO_2$ ,  $R_4=H$ ;
- 7)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=R_3=H$ ,  $R_4=2,4-NO_2Ph$ ;
- 8)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=Br$ ,  $R_3=R_4=H$ ;
- 9)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=Cl$ ,  $R_3=R_4=H$ ;
- 10)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=R_3=Br$ ,  $R_4=H$ ;
- 11)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=R_3=Cl$ ,  $R_4=H$ ;
- 12)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=Cl$ ,  $R_3=N(CH_2CH_2)_2O$ ,  $R_4=H$ ;
- 13)  $R_1=CF_3$ ,  $R_2=R_3=Cl$ ,  $R_4=2-NO_2-4-CF_3-Ph$ .

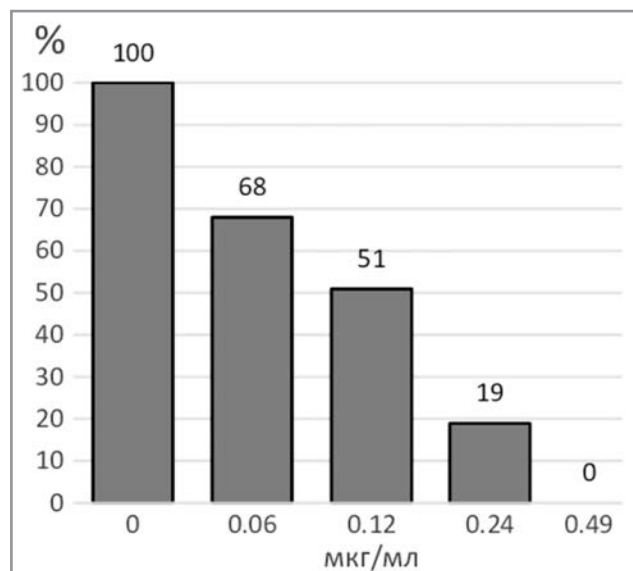
№ вещества	Название соединения	МПК, мкг/мл
1	1- <i>H</i> -бензимидазол	>1000
2	2-метил-1 <i>H</i> -бензимидазол	>1000
3	2-бензил-1- <i>H</i> -бензимидазол	>1000
4	2-(трифторметил)-1 <i>H</i> -бензимидазол	500
5	5-нитро-2-(трифторметил)-1- <i>H</i> -бензимидазол	15,63
6	5,6-динитро-2-(трифторметил)-1- <i>H</i> -бензимидазол	62,50
7	1-(2,4-динитрофенил)-2-(трифторметил)-1- <i>H</i> -бензимидазол	31,25
8	5-бром-2-(трифторметил)-1- <i>H</i> -бензимидазол	7,81
9	5-хлор-2-(трифторметил)-1- <i>H</i> -бензимидазол	7,81
10	5,6-дибром-2-(трифторметил)-1- <i>H</i> -бензимидазол	0,49
11	5,6-дихлор-2-(трифторметил)-1- <i>H</i> -бензимидазол	0,98
12	5-хлор-2-(трифторметил)-6-морфолин-4-ил-1- <i>H</i> -бензимидазол	500
13	5,6-дихлор-1-[2-нитро-4-(трифторметил)фенил]-2-(трифторметил)-1- <i>H</i> -бензимидазол	1000
	Эритромицин	0,98
	Тетрациклин	0,49

Бензимидазол (1) и его 2-алкилпроизводные (2 и 3) не обладали выраженными антибактериальными свойствами. Замена в метильной группе всех атомов водорода на фтор способствовала увеличению противомикробной активности соединения 4. Следует отметить, что трифторметильная группа является эффективным фармакофором [26, 27]. Поэтому в дальнейшем для разработки потенциальных антибактериальных препаратов были использованы нитро- и галогензамещённые производные 2-(трифторметил)-1H-бензимидазола.

Содержащие нитрогруппу бензимидазолы (5–7) были намного более активны по сравнению с веществами 1–4 и имели диапазон значений МПК 15,63–62,50 мкг/мл. При этом бактерицидная активность нитросоединений зависела как от количества нитрогрупп, так и от их положения в молекуле. Наиболее эффективным являлся 5-нитро-2-(трифторметил)-1H-бензимидазол (5). Введение второй нитрогруппы (соединения 6 и 7) увеличивало количество вещества, необходимого для полного ингибирования роста бактерий. Бензимидазол 7, содержащий две нитрогруппы в N-фенильном заместителе, был более активным по сравнению с соединением 6, в котором данные функциональные группы присутствовали в бензольном кольце гетероцикла. По-видимому, введение второй нитрогруппы в молекулу сильно увеличивало полярность вещества, что ухудшало его проникновение через клеточную мембрану.

Галогензамещённые соединения 8–11 обладали большим по сравнению с нитросоединениями 5–7 бактерицидным эффектом. Для них наблюдалась обратная закономерность — с увеличением количества атомов галогенов в бензимидазольном цикле бактерицидные свойства веществ усиливались. Так, 5-бром- (8) и 5-хлор-2-(трифторметил)-1H-бензимидазол (9) имели значение МПК 7,81 мкг/мл, а для 5,6-дибром- (10) и 5,6-дихлор-2-(трифторметил)-1H-бензимидазола (11) это значение составило 0,49 и 0,98 мкг/мл, соответственно. Это, вероятно связано с тем, что введение нескольких атомов галогенов в молекулу не оказывало такого сильного влияния на полярность, как при увеличении количества нитрогрупп.

Следует отметить, что природа галогена в 5-галогензамещённых бензимидазолах 8 и 9 не влияла на их способность ингибировать рост бактерий, в то время как дибромпроизводное 10 было в 2 раза более активно, чем дихлораналог 11. Антибактериальное действие 5,6-дибром-2-(трифторметил)-1H-бензимидазола (10) было сопоставимо с действием коммерческого препарата тетрациклина и в два раза превосходило эритромицин. Уже в концентрации данного вещества 0,06 мкг/мл наблюдалось 32% ингибирование роста *B.subtilis* (рисунок). При использовании рас-



**Влияние различных концентраций 5,6-дибром-2-(трифторметил)-1H-бензимидазола (10) на рост бактерии *B.subtilis* BKM B-407.**

**Примечание.** МПК действующего вещества представлено в виде относительного значения (%) от контроля. За 100% была принята оптическая плотность культуры микроорганизмов без воздействия соединения 10.

**Effect of various concentrations of 5,6-dibromo-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole (10) on the growth of the bacterium *B.subtilis* BKM B-407.**

**Note.** MIC of a compound (10) presented as a relative value (%) of the control. The optical density of the microorganism culture without exposure to compound (10) was taken as 100%.

творов 10 в концентрациях 0,12 и 0,24 мкг/мл происходило примерно в 2 и 5 раз уменьшение бактериального роста, соответственно.

Присутствие в бензимидазоле 11 вместо одного из атомов хлора фармакофора-морфолинового цикла (соединение 12) или введение 2-нитро-4-(трифторметил)фенильного фрагмента (соединение 13) сильно снижали антибактериальную активность веществ.

Таким образом, наличие в бензимидазоле нескольких атомов галогенов и отсутствие сильнополярных групп и объёмных заместителей способствовало проявлению производными бензимидазола сильного бактерицидного эффекта.

## Заключение

Полученные результаты свидетельствовали о наличии у галоген- и нитропроизводных бензимидазола выраженной антибактериальной активности в отношении грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* BKM B-407. Галогенсодержащие бензимидазолы обладали большим ингибирующим рост бактерий эффектом по сравнению с нитропроизводными. С увеличением ко-

личества атомов галогенов в гетероцикле данный эффект усиливался. Сравнение результатов настоящего исследования с ранее полученными данными [8] позволяет сделать вывод о большей чувствительности грамположительных бактерий к действию бензимидазолов. Сделанный вывод хорошо согласуется с данными литературы [25]. В дальнейшем планируется проведение исследований по установлению молекулярных механизмов антибактериального действия соединений этого класса гетероциклов.

## Литература/References

1. Brishty S.R., Hossain Md.J., Khandaker M.U., Faruque M.R.I., Osman H., Rahman S.M.A. A comprehensive account on recent progress in pharmacological activities of benzimidazole derivatives. *Front Pharmacol.* 2021;12: 762807. doi: 10.3389/fphar.2021.762807.
2. Jabłońska-Wawrzycka A., Rogala P., Czerwonka G., Galczyńska K., Drabik M., Dańczuk M. Ruthenium complexes with 2-pyridin-2-yl-1h-benzimidazole as potential antimicrobial agents: Correlation between chemical properties and anti-biofilm effects. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (18): 10113. doi: 10.3390/ijms221810113.
3. Sambanthamoorthy K., Gokhale A.A., Lao W., Parashar V., Neiditch M.B., Semmelhack M.F. et al. Identification of a novel benzimidazole that inhibits bacterial biofilm formation in a broad-spectrum manner. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (9): 4369–4378. doi: 10.1128/aac.00583-11.
4. Shrestha L., Kayama S., Sasaki M., Kato F., Hisatsune J., Tsuruda K. et al. Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microbiol Immunol.* 2016; 60 (3): 148–159. doi: 10.1111/1348-0421.12359.
5. Zha G-F, Preetham H.D., Rangappa S., Sharath Kumar K.S., Girish Y.R., Rakesh K.P. et al. Benzimidazole analogues as efficient arsenals in war against methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its SAR studies. *Bioorg Chem.* 2021; 115: 105175. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105175.
6. Pennings L.J., Ruth M.M., Wertheim H.E.L., van Ingen J. The Benzimidazole SPR719 shows promising concentration-dependent activity and synergy against nontuberculous mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021; 65 (4): e02469–20. doi: 10.1128/aac.02469-20.
7. Starkey M., Lepine F, Maura D., Bandyopadhyaya A., Lesic B., He J. et al. Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. M. Whiteley (ed.). *PLoS Pathogens.* 2014; 10 (8): e1004321. doi: 10.1371/journal.ppat.1004321.
8. Зайцева Ю.В., Егоров Д.О., Бегунов Р.С., Хлопотинин А.И. Антибактериальная и антибиопленочная активность полифункциональных производных бензимидазола. *Acta biomedica scientifica.* 2022; 7 (3): 134–141. doi: <https://doi.org/10.29413/ABS.2022-7.3.14>. [Zaitseva Yu.V., Egorov D.O., Begunov R.S., Khlopotinin A.I. Antibacterial and antibiofilm activity of polyfunctional benzimidazole derivatives. *Acta Biomedica Scientifica.* 2022; 7 (3): 134–141. doi: <https://doi.org/10.29413/ABS.2022-7.3.14>.
9. Andrzejewska M., Yépez-Mulia L., Cedillo-Rivera R., Tapia A., Vilpo L., Vilpo J. et al. Synthesis, antiprotozoal and anticancer activity of substituted 2-trifluoromethyl- and 2-pentafluoroethylbenzimidazoles. *Eur J Med Chem.* 2002; 37 (12): 973–978. doi: 10.1016/s0223-5234(02)01421-6.
10. Laudy A.E., Moo-Puc R., Cedillo-Rivera R., Kazmierczak Z., Orzeszko A. Synthesis and antimicrobial activities of new polyhalogenated benzimidazoles. *J Heterocyclic Chem.* 2012; 49 (5): 1059–1065. doi: 10.1002/jhet.936.
11. Earl A.M., Losick R., Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 2008;16 (6): 269–275. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.004.
12. de Boer Sietske A., Diderichsen B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *App Microbiol Biotechnol.* 1991; 36 (1): 1–4. doi: 10.1007/bf00164689.
13. Moschonas G., Lianou A., Nychas G.E., Panagou E.Z. Spoilage potential of *Bacillus subtilis* in a neutral-pH dairy dessert. *Food Microbiol.* 2021; 95: 103715. doi: 10.1016/j.fm.2020.103715.
14. Pavic S., Brett M., Petric N., Lastre D., Smoljanovic M., Atkinson M. et al. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Archiv für Lebensmittelhygiene.* 2005; 56 (1): 20–22.
15. Apetroaie-Constantin C., Mikkola R., Andersson M.A., Teplova V., Suominen I., Johansson T. et al. *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. *J App Microbiol.* 2009; 106 (6): 1976–1985. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04167.x.

## Дополнительная информация

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках Программы развития ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», проект № П2-ГМ1-2021

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Участие авторов.** Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

16. Zhu T.E., Chen F.F., Li J.C. A strain of pathogenic *Bacillus subtilis* results in brain damage in ducklings when co-infected with *Riemerella anatipestifer*. *Pol J Vet Sci.* 2017; 20 (4): 803–809. doi: 10.1515/pjvs-2017-0101.
17. Gu H., Li M., Sun L. A deep-sea pathogenic *Bacillus subtilis* isolate employs different strategies to escape the killing of teleost and murine complements. *Dev Comp Immunol.* 2021; 119: 104037. doi: 10.1016/j.dci.2021.104037.
18. Патент РФ на изобретение № RU 2509149 C1 от 10.03.2014. Иваненко А.А., Самойленко В.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е. Штамм *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ВКМ В-2711D, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* и резистентностью к стрептомицину и тетрациклину. 2014. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2509149C1/ru>. Ссылка активна на: 16.12.2022. [Patent RUS № 2509149 C1/ 10.03.2014 *Bacillus subtilis* subsp *Subtilis* strain having apparent antagonism in relation to *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and resistance to streptomycin and tetracycline. Dostupno po: <https://patents.google.com/patent/RU2509149C1/ru>. Ssylka aktivna na: 16.12.2022. (in Russian)]
19. Сизенцов А.Н., Блиялкина Д.К., Галактионова Л.В., Сальникова Е.В. Оценка резистентности штаммов *Bacillus subtilis* в отношении антибактериальных препаратов на примере амоксицилина и цефтриаксона. *Аграрная наука.* 2022; 1 (7–8): 74–79. doi: <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-361-7-8-74-79>. [Sizentsov A.N., Bliyalikina D.K., Galaktionova L.V., Salnikova E.V. Evaluation of resistance of isolated soil strains of *Bacillus subtilis* to antibacterial drugs on the example of amoxicillin and ceftriaxone. *Agrarian Science.* 2022; 1 (7–8): 74–79. doi: <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-361-7-8-74-79>. (in Russian)]
20. Еникеев Р.Р., Татарнинова Н.Ю., Захарчук Л.М. Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов, доставленных с международной космической станции. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* 2020; 75 (4): 265–272. <https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour/article/view/937>. [Yenikeev R.R., Tatarinova N.Y., Zakharchuk L.M. Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics of strains of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from samples delivered from the International Space Station. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 16. Biologiya.* 2020; 75 (4): 265–272. <https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour/article/view/937>. (in Russian)]
21. Nwosu V.C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res Microbiol.* 2001; 152 (5): 421–430. doi: 10.1016/s0923-2508(01)01215-3.
22. Донкова Н.В., Донков С.А., Кадетова М.Ю. Изучение устойчивости к антибиотикам бактерий рода *Bacillus* методом серийных разведений. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета.* 2019; 146 (5): 94–100. [Donkova N.V., Donkov S.A., Kadetova M.Y. Studying the stability to antibiotics of bacteria of the genus bacillus by serial breeding method. *Vestnik Krasnoyarskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta.* 2019; 5: 94–100. (in Russian)]
23. Cindrić M., Perić M., Kralj M., Martin-Kleiner I., David-Cordonnier M-H., Paljetak H.Č. et al. Antibacterial and antiproliferative activity of novel 2-benzimidazolyl- and 2-benzothiazolyl-substituted benzo[b]thieno-2-carboxamides. *Mol Divers.* 2018; 22 (3): 637–646. doi: 10.1007/s11030-018-9822-7.
24. Starkey M., Lepine F, Maura D., Bandyopadhyaya A., Lesic B., He J. et al. Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLoS Pathog.* 2014; 10 (8): e1004321. doi: 10.1371/journal.ppat.1004321.
25. Ansari K.F., Lal C. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial activity of some new benzimidazole derivatives. *Eur J Med Chem.* 2009; 44 (10): 4028–33. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.04.037.



26. *Yale H.L.* The trifluoromethyl group in medical chemistry. *J Med Pharm Chem.* 1959; 1 (2): 121–133. doi: 10.1021/jm50003a001.
27. *Singh I., Al-Wahaibi L.H., Srivastava R., Prasad O., Pathak S.K., Kumar S. et al.* DFT study on the electronic properties, spectroscopic profile, and

biological activity of 2-Amino-5-trifluoromethyl-1,3,4-thiadiazole with anticancer properties. *ACS Omega.* 2020; 5 (46): 30073–30087. doi: 10.1021/acsomega.0c04474.

## Информация об авторах

*Бегунов Роман Сергеевич* — к. х. н., доцент, доцент, Факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия. ORCID: 0000-0002-4610-9744

*Егоров Дмитрий Олегович* — аспирант, факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия. ORCID: 0000-0001-9109-023X

*Четвертакова Анна Васильевна* — студентка, факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия

*Савина Луиза Ильинична* — студентка, факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия

*Зубишина Алла Александровна* — к. б. н., доцент, Факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия. eLIBRARY SPIN-код: 3578-4588. AuthorID: 91911

## About the authors

*Roman S. Begunov* — Ph. D. in Chemistry, Associate Professor, Associate Professor, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia. ORCID: 0000-0002-4610-9744

*Dmitry O. Egorov* — Postgraduate Student, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia. ORCID: 0000-0001-9109-023X

*Anna V. Chetvertakova* — Student, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

*Savina Luisa Ilyinichna* — Student, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

*Zubishina Alla Aleksandrovna* — Ph. D. in Biology, Associate Professor, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia. eLibrary SPIN code: 3578-4588. AuthorID: 91911

## ***In vitro* и *in vivo* иммуноадъювантные эффекты модифицированного ферментативным гидролизом фукоидана**

\*Т. А. КУЗНЕЦОВА<sup>1</sup>, Т. П. СМОЛИНА<sup>1</sup>, Л. А. ИВАНУШКО<sup>1</sup>,  
Е. В. ПЕРСИЯНОВА<sup>1</sup>, А. С. СИЛЬЧЕНКО<sup>2</sup>, Н. Н. БЕСЕДНОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова», Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

## ***In vitro* and *in vivo* Immunoadjuvant Effects of the Enzymatically Modified Fucoidan**

\*TATYANA A. KUZNETSOVA<sup>1</sup>, TATYANA A. SMOLINA<sup>1</sup>, LUDMILA A. IVANUSHKO<sup>1</sup>,  
ELENA V. PERSIYANOVA<sup>1</sup>, ARTEM S. SILCHENKO<sup>2</sup>, NATALIA N. BESEDNOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

<sup>2</sup> G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok, Russia

### **Резюме**

**Цель.** Сравнительное изучение иммуноадъювантной активности фукоиданов из бурой водоросли *Fucus evanescens* (образцы 1 и 2) в отношении овальбумина (ОВА) *in vitro* и *in vivo*. **Материал и методы.** Образец 1 — модифицированный ферментативным гидролизом фукоидан, образец 2 — нативный фукоидан. Влияние фукоиданов *in vitro* на уровень экспрессии основных иммунофенотипических маркеров клеток врождённого и адаптивного иммунитета (нейтрофилов, натуральных киллеров, моноцитов, лимфоцитов) исследовали методом проточной цитометрии. Иммуноадъювантные эффекты фукоидана *in vivo* оценивали по продукции сывороточных антител (IgG, IgG1, IgG2a) и цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12) у мышей BALB/c, иммунизированных ОВА. **Результаты.** Исследованные образцы фукоидана активировали эффекторные функции клеток врождённого и адаптивного иммунитета *in vitro* и усиливали Th1 (IgG2a, INF $\gamma$ , IL-2) и Th2 (IgG1, IL-10) иммунный ответ к ОВА *in vivo*. **Выводы.** Иммуноадъювантные эффекты модифицированного ферментативным гидролизом фукоидана сопоставимы с таковыми нативного фукоидана.

**Ключевые слова:** фукоиданы; адъюванты; вакцины; овальбумин; врождённый и адаптивный иммунитет

**Для цитирования:** Кузнецова Т. А., Смолина Т. П., Иванушко Л. А., Персиянова Е. В., Сильченко А. С., Беседнова Н. Н. *In vitro* и *in vivo* иммуноадъювантные эффекты модифицированного ферментативным гидролизом фукоидана. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 25–29. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-25-29>.

### **Abstract**

**Objectives.** No sulfated polysaccharides (fucoidans) has been declared as the pharmaceutical substances, adjuvants, etc., which is associated with the problems of obtaining the structurally characterized and homogeneous samples or their oligomeric fractions that retain high biological activity. The highly purified fucoidan with regular reproducible structural characteristics (F1) was obtained by enzymatic hydrolysis of native fucoidan (F2). **Aim.** The comparative study of fucoidans from the brown alga *Fucus evanescens* (F1 and F2) effects on the effector functions of innate and adaptive immunity cells loaded with ovalbumin (OVA) *in vitro* and *in vivo*. **Material and methods.** Fucoidan F1 — the enzymatically modified product of native fucoidan; F2 — the native fucoidan. The fucoidans effects on the expression level of the main immunophenotypic markers of innate and adaptive immunity (neutrophils, monocytes, natural killers, lymphocytes) cells *in vitro* were studied by methods of flow cytometry. The fucoidans effects on the production of serum OVA-specific antibodies (IgG, IgG1, IgG2a) and cytokines (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12) were detected in BALB/c mice immunized with OVA. **Results.** The tested fucoidans activate the effector functions of innate and adaptive immunity cells loaded with OVA *in vitro* and act as adjuvants, stimulating both Th1 (IgG2a, INF $\gamma$ , IL-2) and Th2 (IgG1, IL-10) immune response to OVA *in vivo*. **Conclusions.** The immunoadjuvant effect of the enzymatically modified fucoidan (F1) on effector functions of innate and adaptive immunity cells are comparable to those of the native fucoidan (F2). The findings determine the possibility of F1 use as an adjuvant for a wide range of prophylactic and therapeutic vaccines.

**Key words:** fucoidans; adjuvants; vaccines; ovalbumin; innate and adaptive immunity

**For citation:** Kuznetsova T. A., Smolina T. P., Ivanushko L. A., Persiyanova E. V., Silchenko A. S., Besednova N. N. *In vitro* and *in vivo* immunoadjuvant effects of the enzymatically modified fucoidan. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 25–29. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-25-29>.

© Коллектив авторов, 2023

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

© Team of Authors, 2023

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

## Введение

Многочисленные исследования свидетельствуют, что сульфатированный полисахарид (фукоидан) из бурой водоросли *Fucus evanescens* обладает высокой биосовместимостью, низкой токсичностью, безопасностью для макроорганизма и проявляет различные экспериментально и клинически доказанные фармакологические эффекты (иммуномодулирующие, противовоспалительные, антикоагулянтные, противоопухолевые, гиполипидемические, гипогликемические, антиоксидантные и др.) [1–4]. Это открывает широкие перспективы для создания препаратов на его основе для биомедицинского применения. Однако в качестве фармацевтических субстанций фукоиданы не заявлены, что связано с проблемами получения стандартизованных, структурно охарактеризованных и однородных образцов или их олигомерных фракций, сохраняющих высокую биологическую активность. Препятствием к получению таких образцов является высокая молекулярная масса фукоиданов, их сложная и нерегулярная структура. Наиболее перспективным подходом к решению этой проблемы является использование ферментативной трансформации фукоиданов. В частности, были получены высокоочищенные ферментативно модифицированные продукты фукоидана из *Fevanescens* с использованием фукоиданазы из морских бактерий *Formosa algae* КММ 3553Т [5]. Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение иммуноадьювантной активности фукоиданов из бурой водоросли *Fevanescens* (модифицированного ферментативным гидролизом и нативного) в отношении овалбумина (ОВА) *in vitro* и *in vivo*.

## Материал и методы

Исследованы два образца фукоиданов из бурой водоросли *Fevanescens*: модифицированный ферментативным гидролизом фукоидан (образец 1) [5] и для сравнения нативный фукоидан в комплексе с полифенолами (образец 2) [6]. Молекулярная масса образца 1 составляет 50,8 кДа, образца 2 — в пределах 130–430 кДа. По результатам ЯМР-анализа образец 1 представляет собой полисахарид с повторяющимися дисахаридными звеньями: [→3)- $\alpha$ -L-Fucp(2,4-SO-3)-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp(2-SO-3)-(1→)n. Полисахарид сульфатирован в основном по C2 и в меньшей степени по C4, ацетильные группы занимают свободное положение при C4 [5].

Исследование *in vitro* проводили с периферической кровью здоровых доноров ( $n=5$ ), взятой в пробирки с гепарином (25 ЕД/мл). Кровь культивировали в среде RPMI 1640 (1:2) с 10% бычьим сывороточным альбумином (БСА), 2 ммоль L-глутамина и 20 мг гентамицина в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в течение 24 ч. Фукоиданы вносили в концентрации 100 мкг/мл, овалбумин (ОВА, EndoFit™ Ovalbumin, InvivoGen Europa, США) — в концентрации 10 мкг/мл. Уровень экспрессии мембранных маркеров оценивали с использованием моноклональных антител к молекулам CD16, CD25, CD69, CD62L, CD11b, HLA-DR, CD56<sup>bright</sup> («Beckman Coulter», США) и соответствующих изотипических контролей. Клетки анализировали с помощью проточного цитометра BD FACS Calibur и программного обеспечения CellQuest (Becton Dickinson, США). Для исключения нежизнеспособных клеток использовали окрашивание 7-AAD (7-аминоактиномицином D). В каждой пробе анализировали минимум 10000 клеток. Результаты представлены в виде среднего процента (%) клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры, или средней интенсивности флуоресценции (MFI), отражающей количество молекул, экспрессированных на клеточной мембране.

Эксперименты *in vivo* на мышax-самцах BALB/c (18–20 г) проводили в соответствии с рекомендациями Европейской комиссии по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других исследованиях, Cets No.: 123 Страсбург, 18.03.1986. Мышей эвтаназировали с использованием эфира. Все экспериментальные исследования были одобрены Этическим комитетом «Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора. Мышей рандомизировали на 4 группы (по 10–12 мышей в каждой), иммунизированных, соответственно: 1 группа — ОВА с образцом 1; 2 группа — ОВА с образцом 2; группа 3 — ОВА с гелем гидроксида алюминия (Sigma, A8222); группа 4 — ОВА в фосфатно-буферном растворе pH 7,2 (ФБР). ОВА вводили в дозе 100 мкг/мышь, фукоиданы — 5 мг/мышь. Суспензию ОВА с фукоиданами или гидроксидом алюминия готовили путём адсорбции на геле гидроксида алюминия в течение 1 ч. В качестве растворителя использовали ФБР. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно 3-кратно с интервалом 2 нед. (0, 14, 28 дни). Сыворотку крови получали от каждой мыши через 35 дней после иммунизации и хранили при температуре –70 °C до титрования. Уровень антител (IgG, IgG1 и IgG2a) в сыворотке крови выявляли с помощью тест-системы Mouse Anti-OVA Antibody Assay Kit (Chodrex, Inc, США) и выражали в Ig мкг/мл. Уровни цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-10) определяли с использованием тест-систем Mouse Platinum ELISA (eBioscience, Австрия). Измерения проводили на микропланшетовом ридере Multiscan RC (Labsystems, Финляндия) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Значимость различий в связанных группах анализировали с применением критерия Уилкоксона, между двумя независимыми группами — критерия Манна–Уитни. Критические  $p < 0,05$  считались статистически значимыми.

## Результаты и обсуждение

Были выявлены значительные изменения функционального состояния нейтрофилов под влиянием обоих образцов фукоиданов: повышение уровня экспрессии молекул активации CD69 и молекул адгезии CD11b, относящихся к семейству  $\beta$ 2-интегринов, а также снижение за счёт шеддинга молекул CD62L (L-селектин) по сравнению с контролем (ФБР) или по сравнению с клетками, инкубированными с ОВА ( $p < 0,05$ ) (рис. 1, таблица). Активация под влиянием фукоиданов моноцитов сопровождалась повышением уровня экспрессии молекул ранней (CD69) и поздней (HLA-DR) активации по сравнению с контролем (ФБР) ( $p < 0,05$ ). Более выраженные изменения функционального состояния нейтрофилов и моноцитов отмечены при совместном инкубировании образца 1 с ОВА по сравнению с контролем (ФБР) или по сравнению с ОВА ( $p < 0,05$ ) (таблица).

Оба образца фукоиданов повышали уровни экспрессии CD16 NK-клетками по сравнению с контролем (ФБР) и CD56<sup>bright</sup> по сравнению с контролем (ФБР, ОВА) ( $p < 0,05$ ). Образец 1, инкубированный с ОВА, и образец 2 повышали уровень экспрессии молекул HLA-DR по сравнению с контролем (ФБР) ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует об активации NK-клеток и повышении их цитотоксического потенциала. Следует отметить, что только в этом случае влияние образца 2 на уровень экспрессии HLA-DR было значимо выше по сравнению с образцом 1 ( $p < 0,05$ ) (см. таблицу).

При инкубировании крови с образцами 1 и 2, а также образца 1 с ОВА на Т-лимфоцитах значимо повышалась экспрессия маркеров активации (CD69, CD25, HLA-DR) по сравнению с контролем (ФБР)

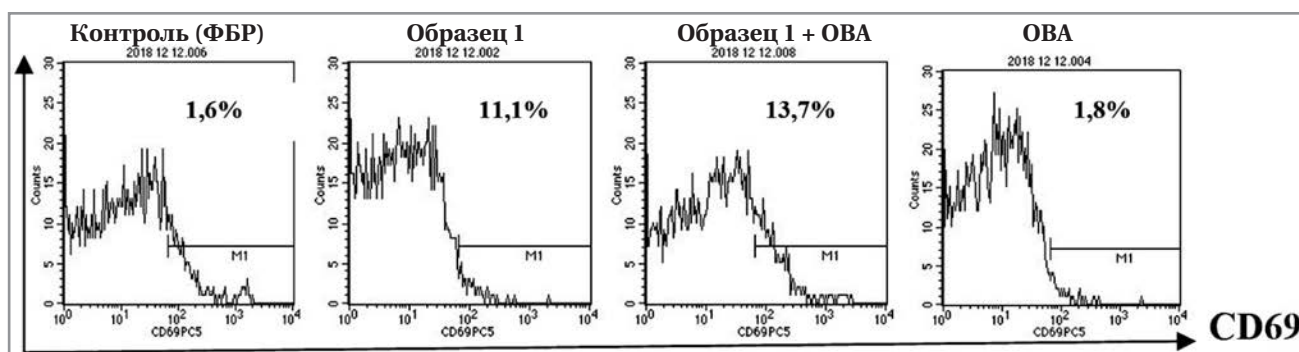


Рис. 1. Влияние модифицированного ферментативным гидролизом фукоидана на экспрессию нейтрофильными лейкоцитами молекул CD69.

Fig. 1. The effect of F1 on CD69 molecules expression by neutrophils.

Влияние образцов фукоидана на экспрессию маркеров активации клетками врождённого и адаптивного иммунитета

The effect of F1 on CD molecules expression by innate and adaptive immunity cells

Субпопуляция клеток	CD маркер и показатель измерения	Фукоидан образец 1	Фукоидан 1+ ОВА	Контроль		
				Фукоидан образец 2	ОВА	ФБР
Нейтрофилы	CD69 (MFI)	26,8* <sup>#</sup> (19–36)	39,6* <sup>#</sup> (18–63)	33,2 <sup>#</sup> (14–54)	14,7 (8–22)	10,3 (4–17)
	CD62L (MFI)	11,5* <sup>#</sup> (8–17)	12,4* <sup>#</sup> (7–19)	13,8 <sup>#</sup> (8–21)	43,1 (27–60)	39,0 (22–8)
	CD11b (MFI)	2621* <sup>#</sup> (1738–3670)	2819* <sup>#</sup> (2332–3934)	2706 <sup>#</sup> (1839–3631)	959* (1298–2653)	1023 (802–1264)
Моноциты	CD69 (MFI)	454,1* <sup>#</sup> (230–680)	624,1* <sup>#</sup> (311–938)	555,4 <sup>#</sup> (243–869)	40,9* (19–61)	28,7 (9–49)
	CD62L (MFI)	7,4* <sup>#</sup> (5–11)	9,6* <sup>#</sup> (5–16)	10,9 <sup>#</sup> (4–17)	28,6 (12–46)	27,8 (11–45)
	HLA-DR (MFI)	161* (112–206)	208* (134–295)	194* (129–278)	158* (98–199)	91 (64–121)
NK-клетки	CD16 (MFI)	56,9* (34–82)	68,4* (42–96)	47,6* (23–73)	46,9* (28–66)	37,5 (25–51)
	CD56 <sup>bright</sup> (%)	8,4* <sup>#</sup> (4–13)	14,9* <sup>#</sup> (10–19)	13,0 <sup>#</sup> (6–21)	4,7 (2–9)	5,9 (3–10)
	HLA-DR (%)	4,7 (3,0–6,4)	9,2* <sup>#</sup> (5,1–14,2)	8,4* <sup>#,##</sup> (6,2–10,5)	4,4 (2,8–6,9)	4,2 (2,1–6,7)
Т-лимфоциты (CD3+)	CD69 (%)	31,4* <sup>#</sup> (19–45)	36,2* <sup>#</sup> (16–59)	26,9* <sup>#</sup> (13–41)	14,1 (9–19)	3,2 (1–5)
	CD25 (%)	9,1* (6,2–14,1)	15,1* <sup>#</sup> (9,2–20,8)	6,4 (4,1–8,8)	7,8 (4,4–11,8)	5,9 (3,7–7,9)
	HLA-DR (%)	6,4* (4,2–8,9)	8,9* <sup>#</sup> (3,3–14,3)	5,4 (3,2–9,0)	4,9 (3,4–8,1)	4,1 (2,1–6,9)
В-лимфоциты (CD20+)	CD69 (%)	25,1* (18,5–28,4)	34,4* <sup>#</sup> (21,9–44,4)	28,7* <sup>#</sup> (16,4–32,6)	14,5 (7,2–21,1)	11,3 (6,2–14,2)
	CD25 (%)	6,6* (4,9–9,5)	10,2* (6,1–13,8)	5,8* (3,3–8,2)	6,9* (4,4–9,1)	2,3 (1,2–3,5)

**Примечание.** Показатели *Me* (медиана) и min-max;  $n=5$ ; \* —  $p<0,05$  — значимость различий показателей по отношению к контролю (ФБР); # —  $p<0,05$  — значимость различий показателей по отношению к контролю (ОВА); ## —  $p<0,05$  — значимость различий показателей образца фукоидана 1 по сравнению с образцом 2.

**Note.** The data *Me* (median) and min-max;  $n=5$ ; \* —  $P<0,05$  — compared to control (PBS); # —  $P<0,05$  — compared to control (OVA); ## —  $P<0,05$  — F1 compared to F2.

( $p<0,05$ ), тогда как по отношению к контролю (ОВА) различия касались только отдельных маркеров. Аналогичная тенденция наблюдалась и в отношении экспрессии маркеров CD69 и CD25 В-клетками (см. таблицу).

В целом эффекты обоих исследованных образцов фукоиданов на экспрессию клеточных маркеров клеток врождённого и адаптивного иммунитета были сопоставимы.

Эффекты на экспрессию клеточных маркеров образца 1 при условии совместного инкубирования с ОВА были более выражены по сравнению с эффектами ОВА. Т. е. в первом случае наблюдалось значительное повышение активационного потенциала клеток врождённого и адаптивного иммунитета. Такая модель (совместное инкубирование иммунокомпетентных клеток с фукоиданом и ОВА) может рассматриваться как *in vitro* модель вакцинной композиции адьюванта с ОВА.

В следующей серии экспериментов исследованы эффекты фукоиданов *in vivo*. Мыши BALB/c, иммунизированные ОВА, продуцировали относительно невысокие уровни общего IgG ( $1,43\pm 0,22$  log мкг/мл) (группа 4), под влиянием образцов 1 и 2 фукоиданов

наблюдался более выраженный иммунный ответ (соответственно уровень общего IgG составил  $2,48\pm 0,41$  lg мкг/мл ( $p<0,05$ ) (1-я группа) и  $2,23\pm 0,43$  lg мкг/мл ( $p<0,05$ ) (2-я группа) по сравнению с контролем (4-я группа). Исследуемые фукоиданы также усиливали продукцию изоформ IgG1 и IgG2a ( $p<0,05$ ), при этом эффекты образцов 1 и 2 на продукцию ОВА-специфических IgG, IgG1 и IgG2a были сопоставимы ( $p<0,05$ ) (рис. 2). Для выявления преобладающего типа иммунного ответа рассчитывалось соотношение IgG1/IgG2a (по мкг/мл), которое составило 2,8 для образцов 1 и 2 и 23 для гидроксида алюминия.

Анализ цитокинового профиля показал, что в сыворотке крови мышей, иммунизированных вакцинными композициями фукоиданов с ОВА (1-я и 2-я группы), наблюдалось увеличение продукции IFN $\gamma$  по сравнению с контролем (4-я группа) ( $p<0,05$ ). Гидроксид алюминия в качестве адьюванта (3-я группа) не влиял на уровень IFN $\gamma$  по сравнению с контролем (4-я группа) ( $p<0,05$ ). Уровень IL-2 под влиянием образцов 1 и 2 значимо отличался от контроля (ОВА) ( $p<0,05$ ), под влиянием гидроксида алюминия эти различия были недостоверны

( $p < 0,05$ ). Такая же тенденция была обнаружена для регуляторного цитокина IL-12. Образец 2 и гидроксид алюминия способствовали повышению продукции IL-10 по сравнению с контролем (группа 4) ( $p < 0,05$ ). В целом эффекты образцов 1 и 2 фукоиданов на продукцию цитокинов были сопоставимы ( $p > 0,05$ ) (рис. 3).

В последние годы в результате интенсивного изучения сульфатированных полисахаридов (фукоиданов) и других природных и синтетических веществ на основе углеводов выявлены их иммуноадьювантные свойства [7–11]. Несмотря на высокую биологическую активность и низкую токсичность, фукоиданы пока не нашли практического применения в качестве фармацевтических субстанций, что связано с трудностями их стандартизации. В нашей работе изучены иммуноадьювантные свойства продукта ферментативного гидролиза фукоидана по сравнению с нативным фукоиданом, который, в отличие от нативного, характеризуется регулярной воспроизводимой структурой. Исследование показало, что продукт ферментативного гидролиза фукоидана повышает активационный потенциал клеток врождённого и адаптивного иммунитета, нагруженных OVA *in vitro*. Также этот образец стимулирует специфический гуморальный иммунный ответ на OVA у мышей, усиливая продукцию как общего IgG, так и его изоформ IgG1 и IgG2a, и продукцию цитокинов Th1 (IFN $\gamma$ , IL-2) и Th2 (IL-10).

Как известно, иммунный ответ на различные антигены требует участия разных типов иммунных ответов. Ответ Th1 коррелирует с индукцией клеточного иммунитета, необходимого для защиты от внутриклеточных инфекционных агентов (бактерий, простейших) и характеризуется продукцией цитокинов IL-2, TNF $\beta$  и IFN $\gamma$  и повышенной продукцией IgG2a, IgG2b, IgG3 у мышей [12]. Ответ Th2 контролирует гуморальный иммунитет, который эффективен для защиты от большинства бактериальных и ряда вирусных инфекций и характеризуется образованием цитокинов IL-4, IL-10 и усиленной продукцией IgG1 [13–15]. Именно адьювант определяет направление иммунного ответа, генерируемого антигенами, по Th1 или Th2 пути [14]. Наши результаты показали, что исследуемые фукоиданы способствуют повышению титров всего спектра OVA-специфических антител (IgG, IgG1, IgG2a) и усилению продукции цитокинов Th1 (IFN $\gamma$ , IL-2) и Th2 (IL-10). Соединения алюминия в качестве адьювантов в большей степени инициируют отклонение иммунного ответа в сторону Th2 [16], что также отражают наши результаты.

## Выводы

Таким образом, тестируемые фукоиданы (модифицированный ферментативным гидролизом и нативный) из бурой водоросли *Evanescens* активируют эффекторные функции клеток врождённого и адаптивного иммунитета, нагруженных OVA *in vitro*, и действуют как адьюванты, стимулируя Th1 (IgG2a, INF $\gamma$ , IL-2) и Th2 (IgG1, IL-10) иммунный ответ *in vivo*. Адьювантное действие фукоиданов связано с активацией клеток врождённого и адаптивного иммунитета и уве-

## Литература/References

1. Alekseyenko T.V., Zhanayeva S.Y., Venediktova A.A., Zuyagintseva T.N., Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Korolenko T.A. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from

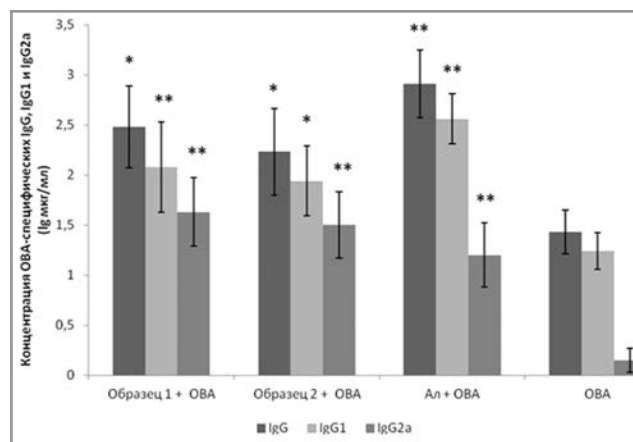


Рис. 2. Уровень OVA-специфических IgG, IgG1 и IgG2a в сыворотке мышей BALB/c.

Примечание. Показатели  $M \pm \delta$ ,  $n=6$ ; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$  — различия значимы по отношению к контролю (OVA).

Fig. 2. The effect of F1 on OVA-specific IgG, IgG1 and IgG2a level in the serum of BALB/c mice.

Note. Here and in Fig 2. The data  $M \pm m$ ,  $n=6$ ; \* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$  — compared to control (OVA).

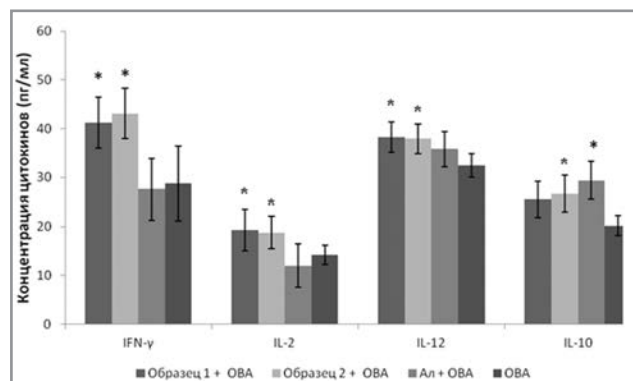


Рис. 3. Влияние образцов фукоидана на продукцию цитокинов в сыворотке крови мышей BALB/c, иммунизированных OVA.

Fig. 3. The effect of F1 on cytokine level in the serum of BALB/c mice immunized with OVA

личением продукции цитокинов, что свидетельствует об усилении их эффекторных функций. Активирующее действие модифицированного ферментативным гидролизом фукоидана сравнимо с таковым нативного фукоидана. С учётом этого, модифицированный фукоидан, полученный ферментативным гидролизом и обладающий регулярной воспроизводимой структурой и меньшей молекулярной массой, может рассматриваться как эффективный и безопасный кандидат в адьюванты для профилактических и терапевтических вакцин. Однако механизмы его адьювантного действия требуют дальнейшего уточнения.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

- the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* brown alga. Bull Exp Biol Med. 2007; 143 (6): 730–732. doi: 10.1007/s10517-007-0226-4.
2. Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Ermakova S.P., Vishchuk O.S., Nazarenko E.L., Dmitrenok P.S., Zuyagintseva T.N. Anticancer activity *in vitro* of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular

- fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry. *Carbohydr Polym.* 2012; 87 (1): 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.036>.
- Menshova R.V., Shevchenko N.M., Imbs T.I., Zvyagintseva T.N., Malyarenko O.S., Zaporozhets T.S., Besednova N.N., Ermakova S.P. Fucoidans from brown alga *Fucus evanescens*: structure and biological activity. *Front Marine Sci.* 2016; 3: 1–9. doi: 10.1177/1934578X1801300837.
  - Запорожец Т. С., Крьюжановский С. П., Персиянова Е. В., Кузнецова Т. А., Смолина Т. П., Газза А. К., Шевченко Н. М., Звягинцева Т. Н., Ермакова С. П., Беседнова Н. Н. Корректирующее действие фукоидана, сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Fucus evanescens*, при формировании специфического иммунного ответа против вирусов сезонного гриппа у пожилых людей. *Антибиотики и химиотер.* 2020; 65 (3–4): 23–28. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-23-28>. [Zaporozhets T.S., Kryzhanovsky S.P., Persianova E.V., Kuznetsova T.A., Smolina T.P., Gazha A.K., Shevchenko N.M., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N., Besednova N.N. The corrective effect of fucoidan, a sulfated polysaccharide extracted from brown algae *Fucus evanescens*, in the formation of a specific immune response against seasonal influenza viruses in the elderly. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2020; 65 (3–4): 23–28. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-23-28>.
  - Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Malyarenko O.S., Shevchenko N.M., Zueva A.O., Kalinovsky A.I., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae*. *Carbohydr Polym.* 2018; 193: 189–195. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.03.094.
  - Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. Structural similarities of fucoidans from brown algae *Silvetia babingtonii* and *Fucus evanescens*, determined by tandem MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydr Res.* 2012; 358: 78–81. doi: 10.1016/j.carres.2012.06.015.
  - Ikewaki N., Iwasaki M., Kurosawa G., Rao K.-S., Lakey-Beitia J., Preethy S., Abraham S.J.K.  $\beta$  glucan vaccine adjuvant approach for cancer treatment through immune enhancement (B VACCIE) in specific immunocompromised populations. *Hum Vaccin Immunother.* 2021; 17 (8): 2808–2813. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8225>.
  - Kim S.-Y., Joo H.-G. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci.* 2015; 16 (2): 145–150. doi: 10.4142/jvs.2015.16.2.145.
  - Kuznetsova T.A., Persyanova E.V., Ermakova S.P., Khotimchenko M.Yu., Besednova N.N. The sulfated polysaccharides of brown algae and products of their enzymatic transformation as potential vaccine adjuvants. *Nat Prod Com.* 2018; 13 (8): 1083–1095. doi: 10.1177/1934578X1801300837.
  - Pifferi C., Fuentes R., Fernández-Tejada A. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action. *Nat Rev Chem.* 2021; 5: 197–216. doi: 10.1038/s41570-020-00244-3.
  - Zhang W., Oda T., Yu Q., Jin J.O. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar Drugs.* 2015; 13: 1084–1104. doi: 10.3390/md13031084.
  - Seder R.A., Hill A.V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature.* 2000; 406:793–798. doi: 10.1038/s41570-020-00244-3.
  - Coffman R.L., Sher A., Seder R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 2010; 33 (4): 492–503. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.002.
  - McKee A.S., Munks M.W., Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity.* 2007; 27: 687–690. doi: 10.1016/j.immuni.2007.11.003.
  - Mathers A.R., Cuff C.F. Role of Interleukin-4 (IL-4) and IL-10 in serum immunoglobulin G antibody responses following mucosal or systemic reovirus. *Infect J Virol.* 2004; 78: 3352–3360. doi: 10.1128/jvi.78.7.3352-3360.2004.
  - Gherardi R.K., Eidi H., Crepeaux G., Authier F.J., Cadusseau J. Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. *Front Neurol.* 2015; 6: 4. doi: 10.3389/fneur.2015.00004.

## Информация об авторах

Кузнецова Татьяна Алексеевна — д. м. н., главный научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-4315-6959. ResearcherID: I-8399-2018. eLIBRARY SPIN-код: 2359-1132. Scopus Author ID: 7202571979

Смолина Татьяна Павловна — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0003-4505-3627. ResearcherID: J-4344-2018. eLIBRARY SPIN-код: 3503-8898. Scopus Author ID: 6603763859

Иванушко Людмила Александровна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии, «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0001-9525-668X. ResearcherID: K-2879-2018. eLIBRARY SPIN-код: 1535-7665. Scopus Author ID: 6507058048

Персиянова Елена Викторовна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии, «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-5686-8672. ResearcherID: I-3513-2018. eLIBRARY SPIN-код: 8385-7621. Scopus Author ID: 56311963200

Сильченко Артем Сергеевич — к. х. н., старший научный сотрудник лаборатории химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия. ORCID: 0000-0002-3502-5692. ResearcherID: M-6894-2013. eLIBRARY SPIN-код: 4416-4006. Scopus Author ID: 6701513689

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

## About the authors

Tatiana A. Kuznetsova — D. Sc. in Medicine, Chief researcher of Immunobiological preparations, G. P. Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-4315-6959. ResearcherID: I-8399-2018. eLIBRARY SPIN-код: 2359-1132. Scopus Author ID: 7202571979

Tatiana P. Smolina — Ph. D. in Biology, Leading researcher of Immunobiological preparations, G. P. Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0003-4505-3627. ResearcherID: J-4344-2018. eLIBRARY SPIN-код: 3503-8898. Scopus Author ID: 6603763859

Ludmila A. Ivanushko — Ph. D. in Medicine, Senior Researcher of Immunobiological preparations, G. P. Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0001-9525-668X. ResearcherID: K-2879-2018. eLIBRARY SPIN-код: 1535-7665. Scopus Author ID: 6507058048

Elena V. Persyanova — Ph. D. in Biology, Senior Researcher of Immunobiological preparations, G. P. Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-5686-8672. ResearcherID: I-3513-2018. eLIBRARY SPIN-код: 8385-7621. Scopus Author ID: 56311963200

Artem S. Silchenko — Ph. D. in Chemistry, Senior researcher of Laboratories of enzyme chemistry, Pacific Institute of Bioorganic Chemistry named after G. B. Elyakova FEB RAS, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-3502-5692. ResearcherID: M-6894-2013. eLIBRARY SPIN-код: 4416-4006. Scopus Author ID: 6701513689

Natalia N. Besednova — D. Sc. in Medicine, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher at the Laboratory of Immunology, G. P. Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia. ORCID: 0000-0002-2760-9778. eLIBRARY SPIN-код: 8931-9002. Scopus Author ID: 7006805123

# Оценка острой токсичности производного хиназолина 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он, активного в отношении условно-патогенных микроорганизмов

\*Н. М. ГАБИТОВА<sup>1</sup>, А. А. ЦИБИЗОВА<sup>1</sup>, А. А. ОЗЕРОВ<sup>2</sup>, М. А. САМОТРУЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград, Россия

## Assessment of Acute Toxicity of Quinazoline Derivative 3-[2-oxo-2-(4-Phenylpiperazine-1-yl)Ethyl]quinazoline-4(3h)-oh Active against Opportunistic Microorganisms

\*NARMINA M. GABITOVA<sup>1</sup>, ALEXANDRA A. TSIBIZOVA<sup>1</sup>, ALEXANDER A. OZEROV<sup>2</sup>, MARINA A. SAMOTRUEVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia

<sup>2</sup> Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Volgograd, Russia

### Резюме

Исследование посвящено изучению острой токсичности нового хиназолинового соединения — 3-[2-Оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он (VMA-10-21), перспективного в качестве противомикробного средства, активного в отношении условно-патогенных микроорганизмов. *Цель.* Оценка острой токсичности производного хиназолина 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он, проявляющего противомикробную активность. *Материал и методы.* Эксперименты проводили на нелинейных половозрелых крысах-самках с массой тела 180–190 г. Особи находились в стадии диэструс. Крысы были разделены на 4 группы случайной выборкой, в каждой группе находилось по 6 особей и до начала эксперимента в течение недели содержались в клетках, привыкая к лабораторным условиям: животные, получавшие интрагастрально эквивалент дистиллированной воды (контроль); опытные животные, получавшие соединение VMA-10-21 в дозах 1000, 2000; 5000 мг/кг (дозы выбраны исходя из того, что исследование токсичности производных пиримидина со схожим химическим строением показали их относительную безопасность и отсутствие летальности от дозы 500 мг/кг). *Результаты.* Оценка острой токсичности производного хиназолина 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он при интрагастральном введении показала, что данное соединение относится к 5 классу токсичности и является малотоксичным. За LD<sub>50</sub> принимается максимальная доза — 5000 мг/кг, при введении которой наблюдались изменения со стороны гемоглобина, количества лейкоцитов и тромбоцитов, а также общего белка, что может свидетельствовать о возможном развитии патологических изменений кровеносной и гепатобилиарной систем. *Выводы.* Хиनाзолиновое производное 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он при интрагастральном введении является малотоксичным и относится к 5 классу токсичности, в связи с чем за LD<sub>50</sub> принимается максимальная доза — 5000 мг/кг. Однако учитывая факт наличия изменений со стороны гематологических и биохимических показателей, данное соединение нуждается в детальном изучении в условиях курсового воздействия на организм животных.

*Ключевые слова:* хиназолиновые производные; острая токсичность; гематологические показатели; биохимические показатели

*Для цитирования:* Габитова Н. М., Цибизова А. А., Озеров А. А., Самотруева М. А. Оценка острой токсичности производного хиназолина 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он, активного в отношении условно-патогенных микроорганизмов. *Антибиотики и химиотерапия.* 2023; 68: 3–4: 30–34. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-30-34>.

### Abstract

The study is devoted to the study of acute toxicity of a new quinazoline compound — 3-[2-Oxo-2-(4-phenylpiperazine-1-yl)ethyl]quinazoline-4(3h)-one (VMA-10-21), promising as an antimicrobial agent active against opportunistic microorganisms. *Purpose.* Assessment of acute toxicity of the quinazoline derivative 3-[2-oxo-2-(4-phenylpiperazine-1-yl)ethyl]quinazoline-4(3h)-oh, exhibiting antimicrobial activity. *Material and methods.* All experiments were carried out on non-linear mature female rats with a body weight of 180–190 g. Female individuals were in the diestrus stage. The rats were di-

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: Бакинская ул., 121. Астраханский ГМУ, г. Астрахань, Россия.  
E-mail: narmina85@inbox.ru

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 121 Bakinskaya st., Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia. E-mail: narmina85@inbox.ru

vided into groups ( $n=6$ ) by a random sample, there were 4 individuals in each group and were kept in cages for a week before the experiment, getting used to laboratory conditions: animals receiving intragastric equiojection of distilled water (control); experimental animals treated with the compound VMA-10-21 at doses of 1000, 2000; 5000 mg / kg (the doses were selected based on the fact that the study of the toxicity of pyrimidine derivatives with a similar chemical structure showed their relative safety and the absence of lethality from a dose of 500 mg / kg). **Results.** Assessment of acute toxicity of the quinazoline derivative 3-[2-oxo-2-(4-phenylpiperazine-1-yl)ethyl]quinazoline-4(3h)-oh with intragastric administration showed that this compound belongs to class 5 toxicity and is low-toxic according to. Under these conditions, and for LD<sub>50</sub>, the maximum dose is 5000 mg / kg. However, despite the results obtained, when this compound was administered at a dose of 5000 mg / kg, changes in hemoglobin, the number of leukocytes and platelets, as well as total protein were observed, which may indicate the possible development of pathological changes in the hematopoietic and hepatobiliary systems. **Conclusion.** Thus, the quinazoline derivative 3-[2-oxo-2-(4-phenylpiperazine-1-yl)ethyl]quinazoline-4(3h)-oh with intragastric administration is low-toxic and belongs to the 5<sup>th</sup> class of toxicity, and therefore the maximum dose is 5000 mg / kg for LD<sub>50</sub>. However, given the fact that there are changes in hematological and biochemical parameters, this compound needs to be studied in detail under the conditions of course effects on the body of animals.

**Keywords:** quinazoline derivatives; acute toxicity; hematological parameters; biochemical parameters

**For citation:** Gabitova N. M., Tsibizova A. A., Ozerov A. A., Samotrueva M. A. Assessment of Acute Toxicity of Quinazoline Derivative 3-[2-oxo-2-(4-Phenylpiperazine-1-yl)Ethyl]quinazoline-4(3h)-oh Active against Opportunistic Microorganisms. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 30–34. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-30-34>.

## Введение

Синтез и поиск новых безопасных соединений, обладающих выраженной фармакологической активностью, в том числе и противомикробной, является актуальной задачей современной фармакологии. В качестве источника фармакологически активных веществ интерес представляют производные хиназолина, относящиеся к N-содержащим гетероциклическим соединениям, характеризующимся разнообразным спектром их биологической активности [1, 2]. Доказано наличие у хиназолиновых субстанций психотропной (антидепрессантной, седативной, антипсихотической, противосудорожной, обезволивающей), противовоспалительной, гипотензивной, иммуотропной, антиоксидантной, противоопухолевой и др. видов активности [3–6]. Синтезирован ряд хиназолиновых соединений с противомикробным действием: противовирусным, противогрибковым, противомаларийным, противомикробным, проявляющимся в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [7–9]. Основными преимуществами данных соединений, наряду с широкой фармакологической активностью, является относительная простота их синтеза, а также возможность улучшения их свойств за счёт применения незначительных модификаций химической формулы [10, 11]. Принимая во внимание вышеописанные сведения, перспективно исследование новых производных хиназолина как лекарственных кандидатов, одним из которых является субстанция 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он (с лабораторным шифром VMA-10-21), синтезированная учёными Волгоградского государственного медицинского университета. В исследованиях показана бактериостатическая активность данного соединения в отношении *Staphylococcus*

*aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* [7, 12].

Несмотря на наличие доказанной фармакологической активности, все новые субстанции на этапе доклинических исследований оцениваются на токсичность. Установлено, что токсичность является причиной отбраковки примерно трети потенциальных лекарственных средств, а также основной причиной высокой стоимости разработки лекарственных средств, особенно в тех случаях, когда она распознаётся на поздних стадиях клинических испытаний [13, 14].

**Цель исследования** — оценка острой токсичности производного хиназолина 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он, проявляющего противомикробную активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

## Материал и методы

Все эксперименты проводили на нелинейных половозрелых крысах самках с массой тела 180–190 г. Особи находились в стадии диэструса. Условия содержания животных осуществлялись согласно правилам лабораторной практики, изложенным в ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96. При кормлении придерживались обычной лабораторной диеты с неограниченным допуском к питьевой воде. Крысы были разделены на 4 группы случайной выборкой, в каждой группе находилось по 6 особей и до начала эксперимента, в течение недели они содержались в клетках, привыкая к лабораторным условиям: животные, получавшие интрагастрально эквивалент дистиллированной воды (контроль); опытные животные, получавшие соединение VMA-10-21 в дозах 1000, 2000; 5000 мг/кг (дозы выбраны исходя из того, что исследование токсичности производных пиримидина со схожим химическим строением показали их относительную безопасность и отсутствие летальности от дозы 500 мг/кг). За 12 ч до введения хиназолиновой субстанции и 4 ч после крыс ограничивали в еде, без ограничений в воде. Изучаемое соединение труднорастворимо в воде, в связи с чем вводилось крысам в виде суспензии в объёме 1 мл/100 г однократно интрагастрально через зонд. Крысы после введения субстанции в течение 14 дней находились под наблюдением; в первые сутки они находились на непрерывном контроле. В течение данного периода оценивали внешний вид, общее состояние, потребление корма и воды, динамику массы тела, поведенческие реакции. На 15-е сутки после вве-



дения VMA-10-21 животных подвергали эвтаназии и проводили патологоанатомическое исследование внутренних органов с оценкой их массовых коэффициентов, а также оценку гематологических и биохимических показателей крови.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакетов программ: Microsoft Office Excel 2007 («Microsoft», США), BIOSTAT 2008 Professional 5.1.3.1. («Analyst-Soft Inc.», США), вычисляя среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического значения ( $m$ ), и представляли в виде  $M \pm m$ . Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений, достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

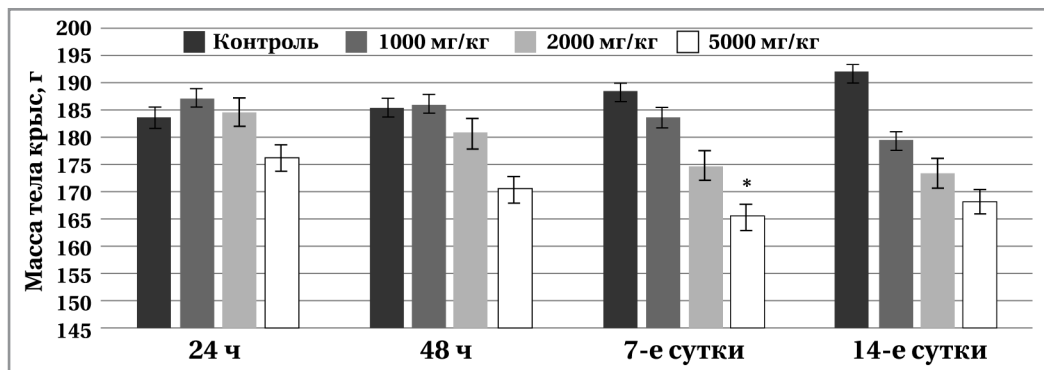
При проведении оценки острой токсичности нового производного хиназолина с лабораторным шифром VMA-10-21 установили, что дозы 1000 и 2000 мг/кг не оказывают влияния на внешний вид, общее состояние, отношение к пище и воде, динамику массы тела и поведенческие реакции. Введение VMA-10-21 в дозе 5000 мг/кг привело к снижению двигательной активности животных и отказу от пищи в течение 2 дней, однако гибели крыс не наблюдалось. На третьи сутки наблюдаемые изменения полностью нивелировались.

Динамика изменения массы тела крыс под влиянием хиназолинового соединения VMA-10-21 показана на рис. 1.

Анализ динамики массы животных показал, что при введении соединения VMA-10-21 в дозах 1000 и 2000 мг/кг практически не наблюдалось статистически значимых изменений, однако при введении производного пиримидина в дозе 5000 мг/кг на 7-е сутки отмечалось снижение массы животных на 12% ( $p < 0,05$ ), к 14-м суткам масса животных практически достигла контрольных значений.

Таким образом, при введении хиназолинового производного VMA-10-21 было установлено, что данное соединение не оказывает негативного воздействия на внешний вид, общее состояние, массу тела и поведенческие реакции животных.

После проведения патологоанатомического исследования было установлено, что у животных, которым вводили производное хиназолина в до-



**Рис. 1.** Динамика массы тела крыс под влиянием 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он

**Примечание.** Здесь и на рис. 2, 3: \* —  $p < 0,05$ ; относительно контроля.

**Fig. 1.** Dynamics of rat body weight under the influence of 3-[2-oxo-2-(4-phenylpiperazine-1-yl)ethyl]quinazoline-4(3h)-oh.

**Note:** \* —  $P < 0,05$ ; regarding control.

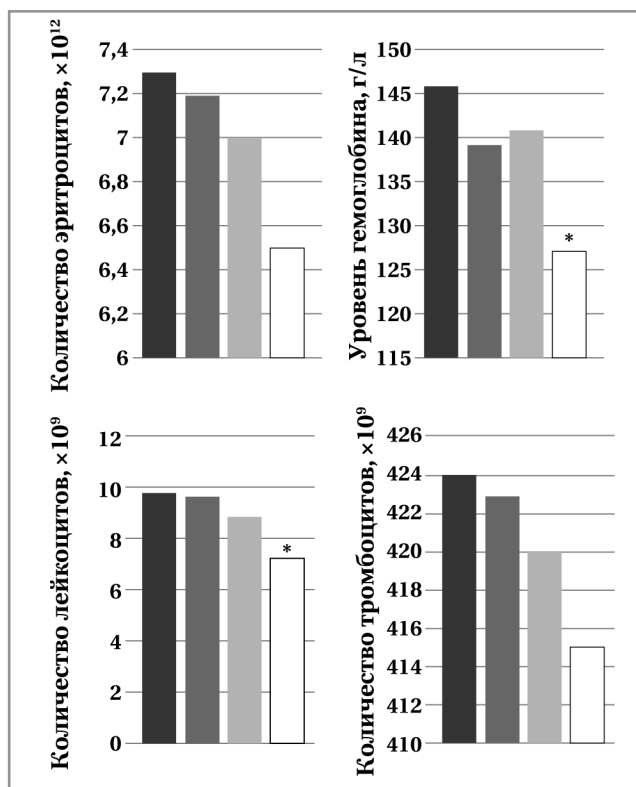
зах 1000 и 2000 мг/кг не было зафиксировано изменения массы внутренних органов, наличия гиперемии, отёков и кровоизлияний, тогда как при введении исследуемого вещества в дозе 5000 мг/кг отмечалось увеличение массы печени на 14% в сравнении с контрольной группой животных, однако эти изменения не имели статистической значимости.

Изменения гематологических показателей на фоне воздействия хиназолинового производного VMA-10-21 показаны на рис. 2. При их оценке получены следующие результаты: введение производного хиназолина VMA-10-21 в дозах 1000 и 2000 мг/кг не привело к статистически значимым изменениям в сравнении с контрольной группой животных; в дозе 5000 мг/кг — было отмечено снижение количества эритроцитов, лейкоцитов и уровня гемоглобина на 11% ( $p > 0,05$ ), 27% ( $p < 0,05$ ) и 13% ( $p < 0,05$ ), количество тромбоцитов практически не изменилось (рис. 2).

Изменения биохимических показателей на фоне воздействия хиназолинового производного VMA-10-21 показаны на рис. 3.

Биохимическое исследование крови показало, что введение соединения VMA-10-21 в дозах 1000, 2000, 5000 мг/кг не привело к статистически значимым изменениям общего белка, общего билирубина, мочевины и креатинина; в дозе 5000 мг/кг было зафиксировано снижение общего белка на 21% ( $p < 0,05$ ) по отношению к контрольной группе животных.

Таким образом, оценка острой токсичности производного хиназолина 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он при интрагастральном введении показала, что данное соединение относится к 5 классу токсичности и является малотоксичным, согласно модифицированной классификации Организации экономического содействия и развития [15]. В данных

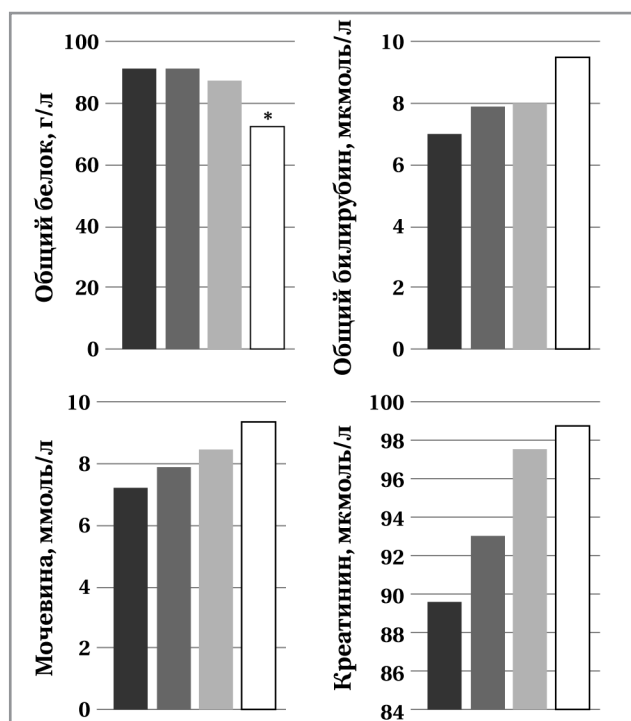


**Рис. 2.** Изменение гематологических показателей на фоне введения пиримидинового производного 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он

**Fig. 2.** Изменение гематологических показателей на фоне введения пиримидинового производного 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он

условиях за  $LD_{50}$  принимается максимальная доза — 5000 мг/кг. При введении данного соединения в дозе 5000 мг/кг наблюдались изменения со стороны гемоглобина, количества лейкоцитов и тромбоцитов, а также общего белка, что может свидетельствовать о возможном развитии патологических изменений кроветворной и гепатобилиарной систем, что актуализирует проведение оценки хронической токсичности исследуемого хиназолинового производного.

Полученные результаты подтверждаются исследованиями, выполненными на примере других производных хиназолина. При проведении исследования токсичности соединения (2-хлор-6-фенил-8H-хиназолино[4,3-b]хиназолин-8-она) не было установлено ни одного вида органотоксичности [16]. Результаты оценки острой токсичности 3-(5-бром-2-гидрокси-3-метоксифенил)-2,3-дигидрохиназолин-4(1H)-e(2) продемонстрировали нетоксичную природу соединений у мышей [17]. В исследованиях на крысах установлена нетоксичность соединения 3-[2-(1-Нафтил)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он [18]. Хи-



**Рис. 3.** Изменение биохимических показателей на фоне введения пиримидинового производного 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он

**Fig. 3.** Изменение биохимических показателей на фоне введения пиримидинового производного 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он

назолиновое соединение сульфат 2-меркапто-5H-[1,3,4]-тиадиазоло-[2,3-b]-хиназолин-5-она с антимикробактериальной активностью является нетоксичным соединением, что было установлено на крысах и мышях в эксперименте [19].

## Заключение

Хиназолиновое производное 3-[2-оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3h)-он при интрагастральном введении является малотоксичным и относится к 5 классу токсичности, в связи с чем за  $LD_{50}$  принимается максимальная доза — 5000 мг/кг. Однако, учитывая факт наличия изменений со стороны гематологических и биохимических показателей, данное соединение нуждается в детальном изучении в условиях курсового воздействия на организм животных.

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

## Литература/References

1. *Mass E. B., Duarte G. V., Rusovsky D.* Hybrids of quinazoline-chalcon and quinazolinone-chalcon: a promising combination for biological activity. *Mini Rev Med Chem.* 2021; 21 (2): 186–203. doi: 10.2174/1389557520666200730160325
2. *Gomaa H. A.* A comprehensive review of the latest achievements in the field of biological activity of quinazolines. *Chemical Biology and Drug Design.* 2022; 100 (5): 639–655. doi: 10.1111/cbdd.14129
3. *Тюренок И. Н., Цибизова А. А., Самотруева М. А., Озеров А. А.* Иммунотропные свойства карбонильного производного хиназолина. *Астраханский медицинский журнал.* 2017; 12 (2): 81–88. [Тюренок И. Н., Цибизова А. А., Самотруева М. А., Озеров А. А. Иммунотропные свойства карбонильного производного хиназолина. *Астраханский медицинский журнал.* 2017; 12 (2): 81–88. (in Russian)]
4. *Karan R., Agarwal P., Sinha M., Mahato N.* Recent advances in the field of quinazoline derivatives: a potential biologically active framework in medical chemistry. *Chemical Engineering.* 2021; 5 (4): 73. doi: 110.3390/chemengineering5040073
5. *Canetti J., Georgieva M., Rangelov M., Filippova I., Vasilyeva B., Angelov I., Staneva D., Miloshev G., Bakalova S.* Biological activity of quinazoline analogues and molecular modeling of their interactions with G-quadruplexes. *Biochem Biophys Acta Gen Subj.* 2021; 1865 (1): 129773. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129773.
6. *Rezaeinab R., Jafari E., Khodarahmi G.* Quinazolinone-based hybrids with diverse biological activity: a mini-review. *Res Med Sci.* 2022; 27: 68. doi: 10.4103/jrms.jrms\_1025\_21.
7. *Самотруева М. А., Озеров А. А., Старикова и др.* Изучение антимикробной активности новых хиназолин-4(3Н)-онов по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. *Фармация и фармакология.* 2021; 9 (4): 318–329. doi: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-4-318-329>. [Самотруева М. А., Озеров А. А., Старикова и др. Изучение антимикробной активности новых хиназолин-4(3Н)-онов по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. *Фармация и фармакология.* 2021; 9 (4): 318–329. doi: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-4-318-329>. (in Russian)]
8. *Patel P.R., Joshi H., Shah U. et al.* New generation of quinazolinone derivatives as potent antimicrobial agents. *Asian Pacific J Health Sci.* 2021; 8 (2): 61–66 doi: doi: 10.21276/apjhs.2021.8.2.12.
9. *Kadhim M. A., EL-Hash M., Risk S.* Nucleosides carrying the quinoline fragment and evaluation of their antimicrobial action. *Anbar University Journal for Pure Science.* 2022; 16 (1): 13–19. doi: 10.37652/juaps.2022.174831.
10. *Faisal M., Saeed A.* Chemical understanding of synthetic chemistry of quinazolines: recent achievements. *Fron Chem.* 2021; 8, 594717. doi: 10.3389/fchem.2020.594717.
11. *Mfalele, M. J.* Review of synthesis and chemical transformation of 3-oxides of quinazoline. *Molecules.* 2022; 27 (22): 985. doi: 10.3390/molecules27227985
12. *Старикова А. А., Габитова Н. М., Цибизова А. А. и др.* Изучение антимикробной активности новых производных хиназолин-4(3Н)-она по отношению к *Echerichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. *Астраханский медицинский журнал.* 2022; 17 (1): 60–71. doi: 10.48612/agmu/2022.17.1.60.71. [Старикова А. А., Габитова Н. М., Цибизова А. А. и др. Изучение антимикробной активности новых производных хиназолин-4(3Н)-она по отношению к *Echerichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. *Астраханский медицинский журнал.* 2022; 17 (1): 60–71. doi: 10.48612/agmu/2022.17.1.60.71. (in Russian)]
13. *Chi L. H., Burrows A. D., Anderson R. L.* Can preclinical drug development help predict adverse events in clinical trials? *Drug Discov Today.* 2022; 27 (1): 257–268. doi: 10.1016/j.drudis.2021.08.010.
14. *Structural bioinformatics: Applications in the preclinical process of drug discovery.* K. G. Mohan (Ed.). New York: Springer., 2019; 27. doi: 10.1007/978-3-030-05282-9.
15. *Дорожкин В. И., Бирюкова Н. П., Бахмутова Т. В.* Современные требования к изучению общетоксического действия фармакологических веществ. *Российский журнал проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии.* 2019; 2: 205–215. doi: 10.25725/vet.san.hyg.ecol.201902015. [Дорожкин В. И., Бирюкова Н. П., Бахмутова Т. В. Современные требования к изучению общетоксического действия фармакологических веществ. *Российский журнал проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии.* 2019; 2: 205–215. doi: 10.25725/vet.san.hyg.ecol.201902015. (in Russian)]
16. *De A. K., Mutin R., Mondal S., Mahanta N., Bhattacharya D., Ponraj P. et al.* The natural derivative of quinazoline from the sea sponge *hyrtios erectus* induces apoptosis of breast cancer cells through the production of ROS and internal or external apoptosis pathways. *Mar Drugs.* 2019; 17 (12): 658. doi: 10.3390/md17120658.
17. *Faraj F.L., Zahedifard M., Paydar M., Looi C.Y., Majid N.A. et al.* Synthesis, characterization, and anticancer activity of new quinazoline derivatives against MCF-7 cells. *Scientific World Journal.* 2014; 2014: 212096. doi: 10.1155/2014/212096.
18. *Ясенявская А. Л., Цибизова А. А., Озеров А. А. и др.* Определение острой токсичности пиримидинового соединения 3-[2-(1-нафтил)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3н)-он. *Современные проблемы науки и образования.* 2021; 4: 61. doi: <https://doi.org/10.17513/spno.30971>. [Ясенявская А. Л., Цибизова А. А., Озеров А. А. и др. Определение острой токсичности пиримидинового соединения 3-[2-(1-нафтил)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3н)-он. *Современные проблемы науки и образования.* 2021; 4: 61. doi: <https://doi.org/10.17513/spno.30971>. (in Russian)]
19. *Сечко О. Г., Царенков В. М., Макаев Ф. и др.* Оценка острой токсичности сульфата 2-меркапто-5н-[1,3,4]-тиадиазоло-[2,3-б]-хиназолин-5-она. *Рецепт.* 2020; 23 (2–3): 214–222. doi: 10.34883/PI.2020.2.2.029. [Сечко О. Г., Царенков В. М., Макаев Ф. и др. Оценка острой токсичности сульфата 2-меркапто-5н-[1,3,4]-тиадиазоло-[2,3-б]-хиназолин-5-она. *Рецепт.* 2020; 23 (2–3): 214–222. doi: 10.34883/PI.2020.2.2.029. (in Russian)]

## Информация об авторах

*Габитова Нармина Муталлимага-кызы* — ассистент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0002-3867-8330

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

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

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

## About the authors

*Narmina M. Gabitova* — Assistant of the Department, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0002-3867-8330

*Aleksandra A. Tsibizova* — Ph. D. in Pharmaceuticals, Senior teacher of the Department, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0002-9994-4751

*Aleksandr A. Ozerov* — D. Sc. in Chemistry, Professor, Head of Department, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia. ORCID ID: 0000-0002-4721-0959

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

# Оценка антисептического действия раствора Анолит на лабораторных крысах

С. Н. СТЯЖКИНА, Н. А. КИРЬЯНОВ, Д. Н. КУКЛИН,  
Х. С. КУТБЕДИНОВ, О. Н. ЕЙКИНА, \*Д. В. СТРАШНОВ

ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, Ижевск, Россия

## Evaluation of the Antiseptic Effect of the Anolyte Solution on Laboratory Rats

SVETLANA N. STYAZHKINA, NIKOLAY A. KIRYANOV, DMITRY N. KUKLIN,  
KHADIATULLO S. KUTBEDINOV, OLGA N. EYKINA, \*DANIL V. STRASHNOV

Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia

### Резюме

Проведено экспериментальное исследование антисептических свойств раствора Анолит. Разработанный раствор анолита обладает антисептическим действием, особенно активным в отношении *Escherichia coli*, что указывает на возможность его использования в комплексной терапии гнойных ран.

**Ключевые слова:** дезинфицирующее средство; Анолит; хлор; кислород; бактерии; вирусы; грибы; малоопасное вещество; антисептик, рана

**Для цитирования:** Стяжкина С. Н., Кирьянов Н. А., Куклин Д. Н., Кутбединов Х. С., Ейкина О. Н., Страшнов Д. В. Оценка антисептического действия раствора Анолит на лабораторных крысах. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 35–38. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-35-38>.

### Abstract

An experimental study of the antiseptic properties of the Anolyte solution was carried out. The developed anolyte solution has an antiseptic effect, especially active against *Escherichia coli*, which indicates the possibility of its use in the complex therapy of purulent wounds.

**Keywords:** disinfectant; Anolyte; chlorine; oxygen; bacteria; viruses; fungi; low-hazard substance; antiseptic; wound

**For citation:** Styazhkina S. N., Kiryanov N. A., Kuklin D. N., Kutbedinov H. S., Eykina O. N., Strashnov D. V. Evaluation of the antiseptic effect of the Anolyte solution on laboratory rats. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 35–38. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-35-38>.

## Введение

История хирургии связана с профилактикой и лечением хирургической инфекции. В последние несколько лет возросла частота гнойных осложнений. Развитие гнойных осложнений резко ухудшает результаты хирургического лечения, удлиняет сроки стационарного лечения, и может привести к летальному исходу [1–4]. Рост осложнений связан со снижением антибиотико-чувствительности патогенных микроорганизмов, а также с увеличением числа иммунокомпрометированных лиц [5]. Исходя из вышесказанного, возникла необходимость в дополнительном антимикробном средстве. Нами был выбран раствор

Анолит. Некоторыми исследователями описаны антисептические свойства анолита [6–8]. Активированный электрохимическим методом водный раствор уничтожает все виды бактерий, вирусов, грибковых патогенов и споровых, то есть возбудителей нозокомиальных инфекций, туберкулёза, легионеллёза; возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы; возбудителей полиомиелита, гепатита А, ротавируса, ВИЧ-инфекции, простуды, гриппа, атипичной пневмонии, парагриппа и других. Но сведения об антимикробном действии раствора недостаточно изучены, что и обусловило необходимость выполнения данного исследования.

Цель исследования — определение антисептического действия раствора Анолит, применяе-

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: ул. Коммунаров, 281, Ижевская ГМА, г. Ижевск, Россия, 426034.  
E-mail: danil.strashnov@inbox.ru

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 281 Kommunarov str., Izhevsk GMA, Izhevsk, Russia, 426034. Moscow, Russia.  
E-mail: danil.strashnov@inbox.ru

мого в комплексной системе дезинфицирующих мероприятий.

## Материал и методы

Определение антисептического действия раствора проводили на здоровых лабораторных белых крысах обоего пола с массой 200–220 г. Животные до начала опыта и во время его содержались в равных условиях и находились в помещении с постоянной температурой, в условиях вивария. Моделирование ран и эксперименты с животными выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Гнойная рана моделировалась крысам под накрозом в стерильных условиях по методу П. И. Толстых с последующей инъекцией *Escherichia coli* ATCC 25922. Для опыта было сформировано 2 группы крыс по 5 голов в каждой. Первой опытной группе крыс рану санировали раствором Анолит, а второй опытной группе крыс — физиологическим раствором 0,9% 3 раза в сутки в течение 10 дней. Процесс заживления раны у крыс проводился путём ежедневного осмотра и санации. Перевязки экспериментальным крысам в опытных группах производили трижды в день, ежедневно в течение 10 сут [9, 10].

Течение раневого процесса у экспериментальных лабораторных крыс оценивали микробиологическим, гистологическим методами. Регистрация показателей и декапитация животных осуществлялись на 1- и 10-е сутки от начала лечения.

Во время стандартного бактериологического исследования определялась микробная обсеменённость раны (КОЕ/1 г ткани) путём посева инфильтрата раны в чашки Петри с плотной питательной средой (агар).

Гистологическое исследование микропрепаратов ран производили на 1- и 10-е сутки от начала лечения после выведения животного из эксперимента. Гистоморфологические исследования проводились на кафедре патологической анатомии под руководством д. м. н., профессора Н. А. Кирьянова.

## Результаты и обсуждение

Во всех группах микробная флора ран на день начала лечения составляла в среднем  $13,6 \pm 1,56 \times 10^7$  КОЕ/г. Далее во всех опытных группах происходило уменьшение микробной обсеменённости ран. На 10-е сутки от начала лечения микробная обсеменённость ран 1-й группы составила  $1,5 \pm 0,36 \times 10^4$  КОЕ/г, а 2-й —  $9,3 \pm 1,12 \times 10^4$  КОЕ/г, что свидетельствует о высокой антисептической активности раствора Анолит. Между опытными сериями достоверных различий выявлено не было.

Гистоморфологическое изучение препаратов ран производили на 1-е и 10-е сутки от начала лечения после декапитации.

В обеих группах к 1-му дню моделирования гнойной раны, вся её поверхность была покрыта массивными гнойно-некротическими массами, где обнаруживалось большое количество погибших лейкоцитов. Прилежащие ткани были резко отёчны и инфильтрированы нейтрофилами и макрофагами. Кровеносные и лимфатические сосуды расширены. Отёк тканей и инфильтрат в сочетании с пропитыванием эритроцитами распространялся за пределы раневого дефекта по всей толщине дермы и переходил на гиподерму (рис. 1).

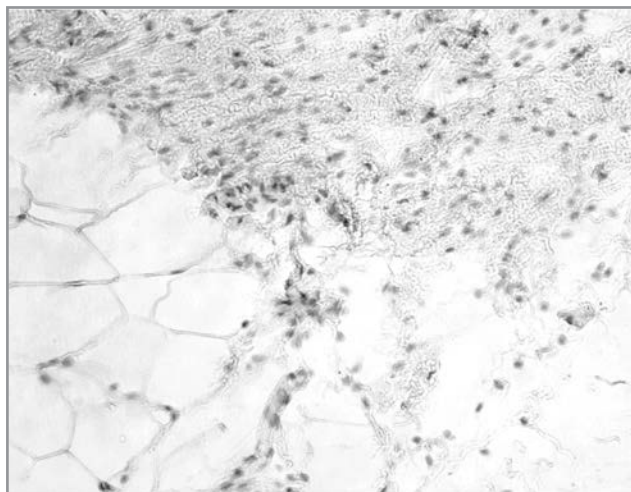


**Рис. 1.** Раневой процесс у крыс опытной группы № 1 в 1-й день эксперимента.

**Примечание.** Рана была покрыта массивным гнойно-некротическими массами, где обнаруживалось большое количество погибших лейкоцитов.

**Fig. 1.** Wound process on the 1<sup>st</sup> day of the experiment of experimental group No. 1. Experimental group No. 1.

**Note.** The wound was covered with massive purulent-necrotic masses, where a large number of dead leukocytes were found.



**Рис. 2.** Микропрепарат раны у крыс опытной группы № 1 на 10-й день эксперимента.

**Примечание.** Новообразованная соединительная ткань хорошо васкуляризована, признаков отёка нет. Реактивные изменения менее выражены. Ув  $\times 400$ . Окраска гематоксилином и эозином.

**Fig. 2.** Experimental group No. 1 on the day 10 of the experiment.

**Note.** The newly formed connective tissue is well vascularized, there are no signs of edema. Reactive changes are less pronounced. Micro-preparation of the wound. Uv  $\times 400$ . Stained with hematoxylin and eosin.



**Рис. 3.** Раневой процесс у крыс опытной группы № 1 на 10-й день эксперимента.

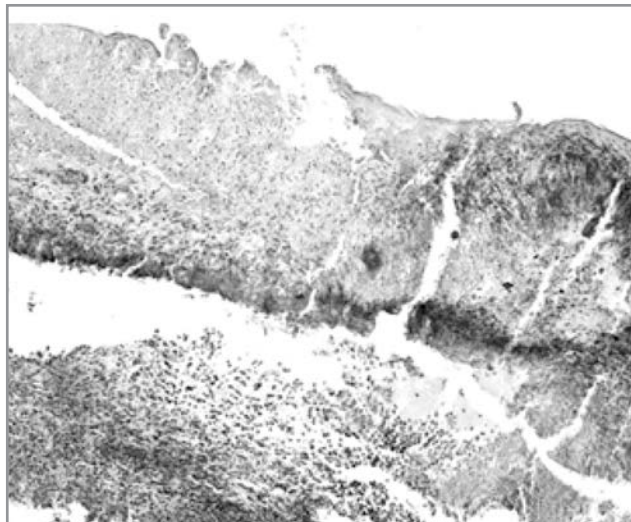
**Примечание.** Рана покрыта лейкоцитарно-некротическим струпом, под струпом грануляционная ткань, признаки эпителизации. Глубокие участки дермы несколько отёчны, массажи, где уживалось большое количество погибших лейкоцитов.

**Fig. 3.** Experimental group No. 1 on the day 10 of the experiment.

**Note.** The wound is covered with a leukocyte-necrotic scab, granulation tissue under the scab, signs of epithelialization. Deep areas of the dermis are somewhat edematous, in masses, where a large number of dead leukocytes got along.

Через 10 дней наблюдения в 1-й группе сравнения происходит формирование эпителиального вала на границе раны. Грануляционная ткань чётко отграничена от интактной дермы и инфильтрирована лейкоцитами. Во всех гистопрепаратах этой группы отмечалось полное покрытие грануляций эпидермисом, который состоял из двух слоёв клеток, были хорошо выражены признаки эпителизации раны. Инфильтрация поверхностных слоёв дермы сохранена. Новообразованная соединительная ткань хорошо васкуляризована, признаков отёка нет. Реактивные изменения менее выражены. Участки регенерировавшего эпителия без выраженных морфологических изменений (рис. 2, 3).

На 10-е сутки наблюдения во 2-й группе рана покрыта лейкоцитарно-некротическим струпом, под струпом грануляционная ткань, признаки эпителизации отсутствуют. Глубокие участки дермы несколько отёчны. Грануляционная ткань покрыта фибрином и достаточно чётко отграничена грануляционным валом. В молодой грануляционной ткани наблюдаются ярко выраженные процессы неоваскуляризации. Грануляционная



**Рис. 4.** Микропрепарат раны у крыс опытной группы № 2 на 10-й день эксперимента.

**Примечание.** Рана покрыта лейкоцитарно-некротическим струпом, под струпом грануляционная ткань, признаки эпителизации отсутствуют. Глубокие участки дермы несколько отёчны. Видны колонии *E.coli*. Ув ×400. Окраска гематоксилином и эозином.

**Fig. 4.** Experimental group No. 2 on the day 10 of the experiment.

**Note.** The wound is covered with a leukocyte-necrotic scab, granulation tissue under the scab, there are no signs of epithelialization. Deep areas of the dermis are somewhat edematous. *E.coli* colonies are visible. Micro-preparation of the wound. Uv ×400. Stained with hematoxylin and eosin.

ткань инфильтрирована нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами (рис. 4).

## Выводы

Таким образом, анализ результатов, полученных при микробиологическом исследовании, показал, что разработанный раствор Анолит обладает антисептическим действием, особенно в отношении *Escherichia coli*, что указывает на возможность его использования в комплексной терапии гнойных ран. Полученные нами результаты микробиологических и гистологических исследований гнойных ран свидетельствуют о более выраженном положительном эффекте, ускорении раневого процесса при санации ран разработанным раствором Анолит.

### Дополнительная информация

**Конфликт интересов.** Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

### Additional information

**Conflict of interests.** The authors of this article report that there is no conflict of interest.

## Литература/References

1. Куклин Д.Н., Стяжкина С.Н., Иванова М.К., Тихонова В.В., Багаутдинов А.Л., Гилимханова А.Р., Вахитова А.И. Действие анолита на патогенную микрофлору. Антибиотики и химиотер. 2022; 67 (5–6): 10–13. [Kuklin D.N., Styazhkina S.N., Ivanova M.K., Tikhonova V.V., Bagautdinov A.L., Gilimkhanova A.R., Vakhitova A.I. The effect of anolyte on pathogenic microflora. Antibiotiki i Khimioter=Antibiotics and Chemother. 2022; 67: (5–6): 10–13. (in Russian)]
2. Куклин Д.Н., Стяжкина С.Н., Тихонова В.В., Кузьяев М.В., Гилимханова А.Р., Вахитова А.И. Влияние анолита на антибиотикочувствительность патогенных микроорганизмов. Modern Science. 2021; 12–2: 79–84. [Kuklin D.N., Styazhkina S.N., Tikhonova V.V., Kuzyaev M.V., Gilimkhanova A.R., Vakhitova A.I. Vliyaniye anolita na antibiotikochuvstvitel'nost' patogennykh mikroorganizmov. Modern Science. 2021; 12–2: 79–84. (in Russian)]
3. Куклин Д.Н., Стяжкина С.Н., Тихонова В.В., Гилимханова А.Р., Вахитова А.И. Влияние анолита на некоторых представителей резидентной бактериальной флоры. Modern Science. 2021; 12–2: 75–79. [Kuklin D.N., Styazhkina S.N., Tikhonova V.V., Gilimkhanova A.R., Vakhitova A.I. Vliyaniye anolita na nekotorykh predstavitelej rezidentnoj bakterial'noj flory. Modern Science. 2021; 12–2: 75–79. (in Russian)]
4. Бутко М.П., Попов П.А., Лемясева С.А., Онищенко Д.А. Технология применения дезинфицирующего средства Анолит АНК-СУПЕР для обеззараживания сточных вод с учётом их санитарной категории. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2017; 21 (1): 17–22. [Butko M.P., Popov P.A., Lemyaseva S.A., Onishchenko D.A. Tekhnologiya primeneniya dezinfitsiruyushchego sredstva Anolit ANK-SUPER dlya obezrazhivaniya stochnykh vod s uchetom ikh sanitarnoy kategorii. Problemy Veterinar'noj Sanitarii, Gigieny i Ekologii. 2017; 21 (1): 17–22. (in Russian)]
5. Стяжкина С.Н., Ситников В.А., Цыпин А.Б. Ксеноселезёнка в эксперименте и клинике. Монография. Ижевск: 1994; 1: 9–15: 34–38: 83. [Styazhkina S.N., Sitnikov V.A., Tsypin A.B. Ksenoselezenka v eksperimente i klinike. Monografiya. Izhevsk: 1994; 1: 9–15: 34–38: 83. (in Russian)]
6. Стяжкина С.Н., Михайлова Н.Г., Коньшина К.А., Акимов А.А. Клинический случай забрюшинного абсцесса и пиелонефрита на фоне сахарного диабета 2 типа. Дневник науки. 2019; 29 (5): 7. [Styazhkina S.N., Mikhajlova N.G., Kon'shina K.A., Akimov A.A. Klinicheskiy sluchaj zabryuzhinnogo abscessa i pielonefrita na fone sakharnogo diabeta 2 tipa. Dnevnik Nauki. 2019; 29 (5): 7. (in Russian)]
7. Бурак И.И., Миклис Н.И., Ширякова Т.А., Григорьева С.В., Черкасова О.А., Юркевич А.Б. Гигиеническая оценка дезинфицирующего средства «Анолит нейтральный». Вестник ВГМУ. 2014; 13 (5): 108–110. [Burak I.I., Miklis N.I., Shiryakova T.A., Grigor'eva S.V., Cherkasova O.A., Jyrkevich A.B. Gigienicheskaya otsenka dezinfitsiruyushchego sredstva «Anolit neitral'nyj». Vestnik VGMU. 2014; 13 (5): 108–110. (in Russian)]
8. Бутко М.П., Попов П.А., Лемясева С.А. Современная технология электрохимического синтеза для получения дезинфицирующих средств, их эффективность и перспектива практического применения. Ветеринария. 2016; 2: 45–50. [Butko M.P., Popov P.A., Lemyaseva S.A. Sovremennaya tekhnologiya elektrokhimicheskogo sinteza dlya polucheniya dezinfitsiruyushchikh sredstv, ikh effektivnost' i perspektiva prakticheskogo primeneniya. Veterinariya. 2016; 2: 45–50. (in Russian)]
9. Николаева А.Р., Стяжкина С.Н., Емельянова А.М. Особенности течения раневого процесса при применении Ронколейкина и мази «Левомиколь» при лечении гнойных ран. Сборник избранных статей по материалам научных конференций ГНИИ «Нацразвитие». 2021; 55–58. [Nikolaeva A.R., Styazhkina S.N., Emel'yanova A.M. Osobennosti techeniya ranevogo protsessa pri primeneni Runkolejkina i mazi «Levomikol'» pri lechenii gnoynykh ran. Sbornik izbrannykh statej po materialam nauchnykh konferentsii GНИИ «Natsrazvitie». 2021; 55–58. (in Russian)]
10. Бутко М.П., Попов П.А., Лемясева С.А., Онищенко Д.А. Применение дезинфицирующего средства «Анолит АНКСУПЕР» для дезинфекции цехов убоя и первичной переработке скота. Проблемы ветеринарной санитарии гигиены и экологии. 2018; 26 (2): 31–35. [Butko M.P., Popov P.A., Lemyaseva S.A., Onishchenko D.A. Primenenie dezinfitsiruyushchego sredstva «Anolit ANKSUPER» dlya dezinfektsii tsekhov uboya i pervichnoj pererabotke skota. Problemy veterinar'noj sanitarii gigieny i ekologii. 2018; 26 (2): 31–35. (in Russian)]
11. Бутко М.П., Попов П.А., Лемясева С.А., Онищенко Д.А. Дезинфекция специализированных транспортных средств с применением препарата «Анолит АНК-СУПЕР. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2017; 22 (2): 31–36. [Butko M.P., Popov P.A., Lemyaseva S.A., Onishchenko D.A. Dezinfektsiya spetsializirovannykh transportnykh sredstv s primeneniem preparata «Anolit ANK-SUPER. Problemy Veterinar'noj Sanitarii, Gigieny i Ekologii. 2017; 22 (2): 31–36. (in Russian)]

## Информация об авторах

Стяжкина Светлана Николаевна — д. м. н., профессор кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ижевск, Россия

Кирьянов Николай Александрович — д. м. н., профессор заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ижевск, Россия

Куклин Дмитрий Николаевич — врач-уролог, БУЗ УР Первая республиканская клиническая больница МЗ УР, Ижевск, Россия

Кутбединов Хадиятулло Сульфитдинович — аспирант кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ижевск, Россия

Ейкина Ольга Николаевна — студентка ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ижевск, Россия. ORCID: 0000-0003-2995-9322.

Страшинов Данил Владимирович — студент ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ижевск, Россия. ORCID: 0000-0002-2004-4831

## About the authors

Svetlana N. Styazhkina — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of faculty surgery of the Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, Russia

Nikolay A. Kiryanov — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy of the Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, Russia

Dmitry N. Kuklin — urologist, First Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Udmurt Republic, Izhevsk, Russia

Khadiatullo S. Kutbedinov — Postgraduate student of the Department of Faculty Surgery of the Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, Russia

Olga N. Eykina — Student of the Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2995-9322

Danil V. Strashnov — Student of the Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Izhevsk, Russia. ORCID: 0000-0002-2004-4831

# Ассоциация экспрессии эстрогеновых рецепторов бета с показателем пролиферативной активности Ki-67 в ткани рака молочной железы

\*Т. А. БОГУШ<sup>1</sup>, П. Д. ПОЦЕЛУЕВА<sup>1,2</sup>, А. М. ЩЕРБАКОВ<sup>1</sup>, Е. А. БОГУШ<sup>3</sup>,  
А. Б. РАВЧЕЕВА<sup>1</sup>, Н. О. ВИХЛЯНЦЕВА<sup>1</sup>, В. С. КОСОРУКОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

## Association of the Estrogen Receptors Beta Expression with the Ki-67 Proliferative Index in Breast Cancer

\*TATIANA A. BOGUSH<sup>1</sup>, POLINA D. POTSELUEVA<sup>1,2</sup>, ALEXANDER M. SCHERBAKOV<sup>1</sup>,  
ELENA A. BOGUSH<sup>3</sup>, ANNA B. RAVCHEEVA<sup>1</sup>, NADEZHDA O. VIKHLYANTSEVA<sup>1</sup>,  
VYACHESLAV S. KOSORUKOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>2</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University (Lomonosov MSU), Moscow, Russia

<sup>3</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

### Резюме

**Актуальность.** Эстрогеновые рецепторы бета (ERβ) являются важным биологическим регулятором и мишенью антиэстрогенов, однако, в отличие от эстрогеновых рецепторов альфа (ERα), их значимость в прогнозе и лечении рака молочной железы (РМЖ) остаётся неопределённой. **Цель исследования.** Выявление прогностической значимости ERβ при сравнительной оценке уровня и частоты встречаемости экспрессии ERβ в группах с благоприятным и неблагоприятным прогнозом РМЖ по показателю экспрессии маркера пролиферативной активности опухоли Ki-67. **Методы.** Проведена количественная оценка уровня экспрессии ERβ (% клеток, экспрессирующих маркер) в 68 хирургических образцах ткани РМЖ иммунофлуоресцентным методом с использованием проточной цитометрии. Использованы первичные антитела к ERβ (клон 14C8, ab288) и вторичные, конъюгированные с DyLight650 (ab98729). В тех же образцах иммуногистохимическим методом оценён уровень экспрессии Ki-67. **Результаты.** Экспрессия ERβ и Ki-67 в ткани РМЖ выявлена в 100% исследованных опухолей с высокой гетерогенностью показателя у разных больных. Статистический анализ групп благоприятного и неблагоприятного прогноза в соответствии с пролиферативной активностью опухоли (Ki-67 ≤ 20% и Ki-67 > 20%) показал прогностическую информативность деления опухолей по уровню экспрессии ERβ 50%. Ассоциативной связи между уровнем экспрессии Ki-67 и ERβ в одном и том же образце опухоли не обнаружено (коэффициент ранговой корреляции Спирмена  $r = -0,16$ ;  $p > 0,05$ ). В то же время высокая экспрессия ERβ ≥ 50% в 2,3 раза чаще выявлялась в прогностически благоприятной vs неблагоприятной по показателю Ki-67 группе — 41% vs 18%,  $p = 0,02$ . **Заключение.** Уровень экспрессии ERβ ≥ 50% в опухоли может рассматриваться как фактор благоприятного прогноза агрессивности течения РМЖ.

**Ключевые слова:** рак молочной железы; эстрогеновые рецепторы бета (ERβ); Ki-67; проточная цитометрия; иммунофлуоресцентный анализ; прогноз

**Для цитирования:** Богуш Т. А., Поцелуева П. Д., Щербаков А. М., Богуш Е. А., Равчеева А. Б., Вихлянцова Н. О., Косоруков В. С. Ассоциация экспрессии эстрогеновых рецепторов бета с показателем пролиферативной активности Ki-67 в ткани рака молочной железы. *Антибиотики и химиотерапия.* 2023; 68: 3–4: 39–45. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-39-45>.

### Abstract

**Background.** Estrogen receptors beta (ERβ) are an important biological regulator and target of antiestrogens, however, unlike estrogen receptors alpha (ERα), their significance in the prognosis and treatment of breast cancer remains unclear. **Purpose.** Evaluation of the ERβ prognostic value in the comparative assessment of frequency and level of the marker expression in groups with good and poor prognosis by Ki-67 proliferative index score in breast cancer. **Methods.** ERβ expression level (% of cells expressing the marker) in 68 breast tissue samples was quantified by immunofluorescence and flow cytometry. Primary antibodies to ERβ (clone 14C8, ab288) and secondary antibodies conjugated with DyLight650 (ab98729) were used. In the same samples, the Ki-67 expression level was assessed by the immunohistochemical method. **Results.** The ERβ and Ki-67 were detected in 100% breast tissue samples with high heterogeneity of the markers' expression in different

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: Каширское шоссе, д. 24,  
НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, г. Москва, Россия, 115478.  
E-mail: tatbogush@mail.ru

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 24 Kashirskoye Shosse, N. N. Blokhin  
Russian Cancer Research Center, Moscow, 115478 Russia.  
E-mail: tatbogush@mail.ru



patients. Statistical analysis of good and poor prognosis in accordance with the Ki-67 proliferative index score (Ki-67 $\leq$ 20% and Ki-67 $>$ 20%) showed the prognostic value of the ER $\beta$  expression level of 50%. There was no association between the Ki-67 and ER $\beta$  expression levels in the same tumor sample (Spearman's rank correlation coefficient  $R=-0,16$ ;  $P>0,05$ ). At the same time, high expression of ER $\beta \geq 50\%$  was 2,3 times more frequently detected in the good vs poor prognostic group by Ki-67 — 41% vs 18%,  $P=0,02$ . **Conclusion.** The ER $\beta$  expression level  $\geq 50\%$  in the tumor can be considered as a factor of good prognosis of breast cancer.

**Keywords:** breast cancer; estrogen receptor beta (ER $\beta$ ); Ki-67; flow cytometry; immunofluorescence analysis, prognosis

**For citation:** Bogush T. A., Potselueva P. D., Scherbakov A. M., Bogush E. A., Ravcheeva A. B., Vikhlyantseva N. O., Kosorukov V. S. Association of the estrogen receptors beta expression with the Ki-67 proliferative index in breast cancer tissues. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 39–45. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-39-45>.

## Введение

В онкологической практике выбор индивидуальной лечебной тактики формируется, исходя из комплексной оценки признанных прогностических и предиктивных факторов. Так, среди обязательных гистопатологических параметров в ткани рака молочной железы в настоящее время выделяют маркёры ER $\alpha$ , PR, HER2 и Ki-67, исследуемые рутинно иммуногистохимическим методом [1, 2]. В 1996 году открыты ER $\beta$  [3], которые также экспрессируются в клетках рака молочной железы, относятся к семейству стероидных рецепторов и активно изучаются с точки зрения прогностической значимости маркёра, а также потенциальной мишени гормонотерапии [4, 5]. Тем не менее, данные о биологической активности ER $\beta$  остаются противоречивыми и требуют дальнейших исследований.

Роль ER $\beta$  в патофизиологических механизмах злокачественных новообразований, несмотря на высокий уровень гомологии с ER $\alpha$ , обладающими пропролиферативными эффектами, не идентична [6]. Весьма противоречивы данные об уровне экспрессии этого белка в различных тканях и его роли в регуляции пролиферации и химиотерапевтической устойчивости клеток [7]. Остаётся открытым вопрос о взаимосвязи ER $\beta$  с клинически значимой характеристикой — с пролиферативной активностью рака молочной железы [8, 9]. В фундаментальных исследованиях доказано антипролиферативное действие ER $\beta$  [7, 10–12], что говорит о важности установления клинической ценности маркёра и внедрения его оценки в клиническую практику.

Однако до настоящего времени результаты клинических исследований содержат противоречивые данные о прогностической значимости ER $\beta$  [13]. Так, S. Mann и соавт. [14], впервые исследуя корреляцию экспрессии ER $\beta$  в ткани рака молочной железы с агрессивностью течения болезни у пациенток, получающих адъювантное лечение тамоксифеном, обнаружили ассоциацию повышенного уровня экспрессии маркёра с лучшей безрецидивной и общей выживаемостью, что позднее подтверждено в ряде исследований [15–17]. В метаанализе 2016 г. обобщены

результаты по исследованию прогностической значимости высокого уровня экспрессии ER $\beta$ , в том числе в зависимости от статуса ER $\alpha$ , и сделан вывод о связи показателя с лучшей безрецидивной и общей выживаемостью больных раком молочной железы на ранних стадиях заболевания [18].

В то же время показано, что высокий уровень экспрессии ER $\beta$  является неблагоприятным прогностическим фактором у больных раком молочной железы [19–21]. В обзоре 2020 г., посвящённом оценке результатов работ по изучению клинической значимости ER $\beta$ , упоминается также об отсутствии в большинстве исследований корреляции экспрессии данного маркёра с прогностически значимыми клинико-морфологическими характеристиками заболевания, такими как размер опухоли, инвазия в регионарные лимфатические узлы, лимфососудистая инвазия [22].

Важно, что в подавляющем большинстве исследований при полуколичественном определении уровня экспрессии ER $\beta$  использован иммуногистохимический метод, в более редких случаях — ПЦР и иммуноблотт [13]. При этом результаты оценки экспрессии ER $\beta$  в ткани рака молочной железы значительно варьируют в разных исследованиях — от 20 до 80% [22, 23].

В настоящем исследовании предпринята попытка оценить прогностическую значимость уровня ER $\beta$  в ткани рака молочной железы в зависимости от пролиферативной активности опухоли, определяемой по уровню экспрессии белка Ki-67, который ассоциирован с агрессивностью болезни [24–26]. Необходимо отметить, что использование проточной цитометрии для оценки результатов иммунофлуоресцентного анализа позволяет с высокой точностью выявить не только факт экспрессии в опухоли исследуемого маркёра, но и определить пограничное значение между прогностически благоприятным и неблагоприятным уровнем экспрессии ER $\beta$  в ткани рака молочной железы.

## Материал и методы

Исследованы образцы рака молочной железы 68 пациенток, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» в период с 2003 по 2014 гг. Рутинно имму-

**Таблица 1. Показатели уровня экспрессии ERβ и Ki-67 в образцах рака молочной железы****Table 1. ERβ and Ki-67 expression levels in breast cancer samples**

Маркёры	Уровень экспрессии, %			
	M±SD <sup>1</sup>	Me [Q1; Q3] <sup>2</sup>	Min <sup>3</sup>	Max <sup>4</sup>
ERβ	41,7±14,0	42,0 [27,3; 53,0]	15,0	74,0
Ki-67	29,2±23,4	19,0 [14,0; 40,0]	3,0	85,0

**Примечание.** <sup>1</sup> M±SD — среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение; <sup>2</sup> Me [Q1; Q3] — медиана [нижний квартиль, верхний квартиль]; <sup>3</sup> Min — минимальное значение; <sup>4</sup> Max — максимальное значение.

**Note.** <sup>1</sup> M±SD — mean ± standard deviation; <sup>2</sup> Me [Q1; Q3] — median [lower quartile, upper quartile]; <sup>3</sup> Min — minimum value; <sup>4</sup> Max — the maximum value.

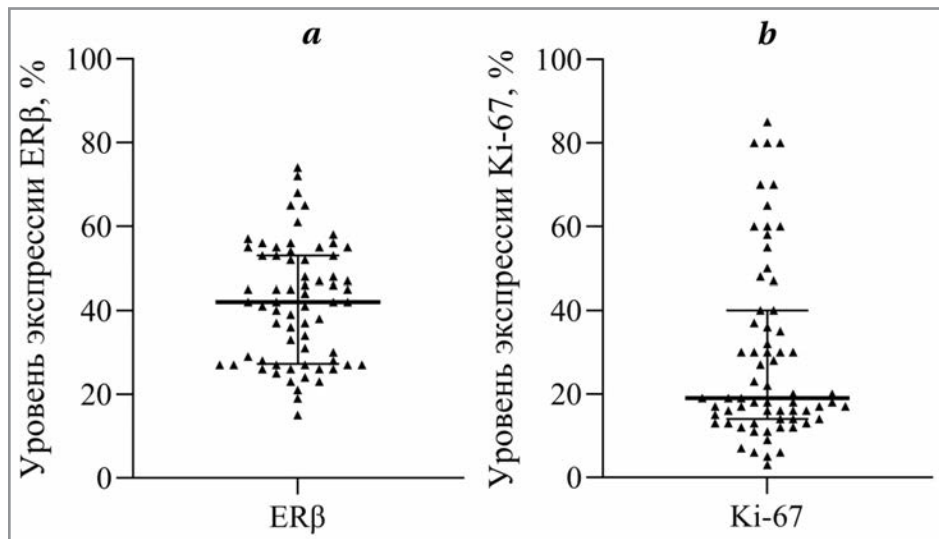
ногистохимическим методом образцы охарактеризованы по уровню экспрессии маркёра пролиферативной активности опухоли Ki-67. Согласно клиническим рекомендациям [2], группы благоприятного и неблагоприятного прогноза по уровню экспрессии Ki-67 составили образцы с уровнем маркёра <20% и >20%, соответственно.

Экспрессия ERβ оценена с помощью ранее разработанного метода количественной характеристики молекулярных белковых маркёров в ткани солидных опухолей — иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированного с проточной цитометрией [27].

Кратко, в работе использованы первичные мышинные антитела к ERβ клона 14C8 (ab288, Abscam) в конечном разведении 1:1600 и вторичные антимышинные антитела, конъюгированные с красителем DyLight650 (ab98729, Abscam) в конечном разведении 1:1000. Одноклеточную суспензию (200 тыс. клеток/мл), приготовленную из солидной ткани по следующей методике [27], в объёме 100 мкл инкубировали с первичными антителами в течение ночи (15–20 ч) при 4°C. Далее, после отмывки клеток 20-кратным объёмом 0,5% раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA), добавляли вторичные антитела и инкубировали в течение 1,5 ч при 4°C. Для удаления из анализа разрушенных клеток, эритроцитов и конгломератов суспензию в течение 15 мин инкубировали с ДНК красителем Hoechst H33258 (Sigma-Aldrich), в концентрации 1,2 мкг/мл, после чего провели двукратную отмывку 20-кратным объёмом 0,5% раствором BSA.

Измерение флуоресценции клеток проводили на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter). В работе оценивали уровень экспрессии ERβ — процентное число специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля (инкубация клеток только с вторичными антителами), рассчитанный в программе FlowJo 10.0 (FlowJo, LLC) с помощью теста Колмогорова–Смирнова.

Для обработки полученных результатов использованы статистические методы, включенные в пакет программы GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software). Критерий Шапиро–Уилка применён для оценки характера распределения образцов по уровню экспрессии маркёров. Оценка ассоциативной связи между уровнем экспрессии Ki-67 и ERβ проведена с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена и критерия  $\chi^2$ . Результаты статистического анализа считались значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Рис. 1. Распределение образцов РМЖ по уровню экспрессии ERβ (a) и Ki-67 (b).**

**Примечание.** По оси ординат обозначен уровень экспрессии маркёра в процентах. Центральная горизонтальная линия обозначает медиану показателя, две остальные — квартили показателей выше и ниже медианы.

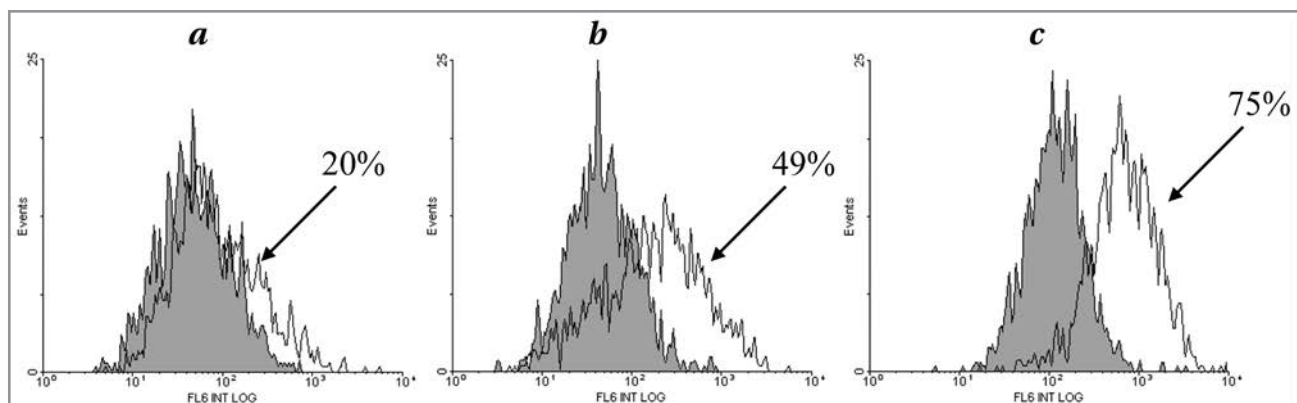
**Fig. 1. Distribution of breast cancer samples by the expression level of ERβ (a) and Ki-67 (b).**

**Note.** The level of marker expression (%) is denoted along the ordinate axis. The central horizontal line denotes the median, and the others depict the lower quartile to upper quartile percentile data range.

## Результаты и обсуждение

Результаты оценки в ткани РМЖ уровня экспрессии ERβ и Ki-67 представлены в табл. 1 и графически на рис. 1. Видно, что экспрессия ERβ выявлена в 100% исследованных опухолей с высокой гетерогенностью показателя у разных больных — от 15 до 74%. Выраженная гетерогенность опухолей отмечена и по экспрессии маркёра пролиферативной активности Ki-67 — от 3 до 85%, при этом ожидаемо маркёр также выявлен в 100% исследованных образцов РМЖ. Средние значения уровня экспрессии ERβ и Ki-67 составили 41,7±14,0% и 29,2±23,4%, медиана — 42 и 19%, соответственно.

Примеры реальных гистограмм распределения клеток по уровню флуоресценции, использованных для количественной оценки экспрессии ERβ, представлены на рис. 2. Гистограмма (a) демонстрирует вариант опухоли с экспрессией ERβ ниже, а гистограммы (b) и (c) — выше медианы значений показателя в исследованной группе опухолей.



**Рис. 2.** Примеры гистограмм распределения клеток в зависимости от флуоресценции, использованных для количественной оценки уровня экспрессии ERβ в ткани рака молочной железы.

**Примечание.** *a* — экспрессия ERβ ниже медианы; *b* и *c* — экспрессия ERβ выше медианы.

**Fig. 2.** Examples of histograms of cell distribution depending on fluorescence used to quantify the ERβ expression level in breast cancer tissue.

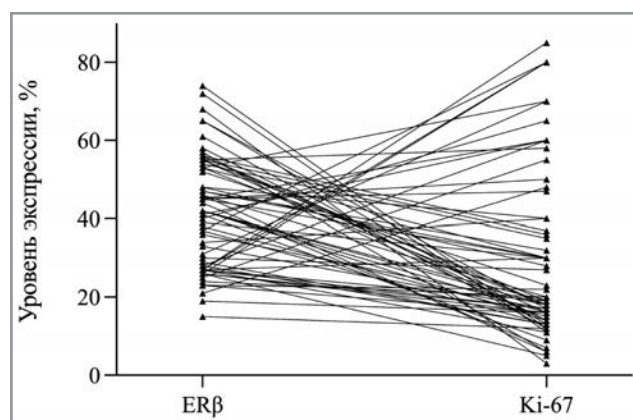
**Note.** *a* — ERβ expression is lower the median; *b* и *c* — ERβ expression is upper the median.

Для выявления возможной связи между экспрессией в опухоли Ki-67 и ERβ проведён анализ коэкспрессии ERβ и Ki-67 в одном и том же образце рака молочной железы. Данные представлены на рис. 3.

Видно, что ассоциативной связи между исследованными маркерами нет. С учётом распределения уровня экспрессии Ki-67, не подчинявшегося закону нормального распределения (критерий Шапиро–Уилка,  $p < 0,0001$ ), статистически значимая корреляция между ERβ и Ki-67 с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена, действительно, не обнаружена ( $r = -0,16$ ;  $p > 0,05$ ).

Для выявления прогностической значимости уровня экспрессии в опухоли ERβ сформированы подгруппы сравнения с благоприятным и неблагоприятным прогнозом течения болезни по показателю экспрессии в опухоли маркера пролиферативной активности Ki-67. На основании клинических рекомендаций [2] уровень экспрессии в опухоли Ki-67  $\leq 20\%$  является прогностически благоприятным показателем, тогда как экспрессия Ki-67  $> 20\%$  прогнозирует агрессивное течение болезни. В итоге, в подгруппы благоприятного (Ki-67  $\leq 20\%$ ) и неблагоприятного прогноза (Ki-67  $> 20\%$ ) вошли 39 и 29 пациенток, соответственно.

Деление на подгруппы с высокой и низкой экспрессией ERβ проведено в соответствии с общепринятой практикой, а именно, по значению показателя, близкого к медиане. В настоящем исследовании нахождение уровня экспрессии ERβ, который может быть прогностически информативным, проведено на основании оценки частоты встречаемости опухолей с разной экспрессией ERβ у больных с благоприятным и неблагоприятным прогнозом течения болезни при уровне



**Рис. 3.** Ассоциативная связь между уровнем экспрессии Ki-67 и ERβ, оцененная в одном и том же образце опухоли.

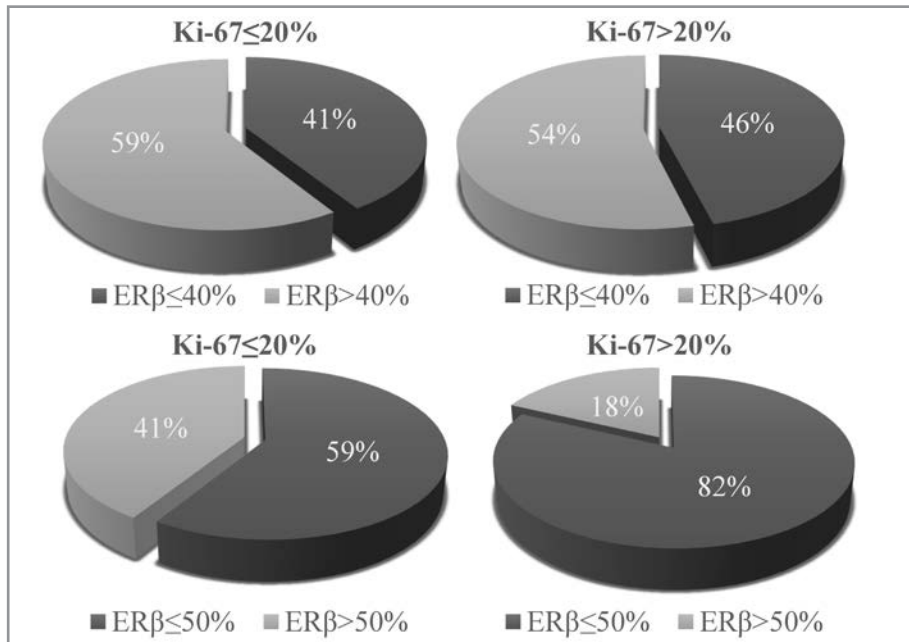
**Fig. 3.** Association between the Ki-67 and ERβ expression level evaluated in the same tumor sample.

ERβ в опухоли 40% и 50%. Полученные результаты представлены на рис. 4.

Не обнаружено различий между группами сравнения с высоким ( $> 20\%$ ) и низким ( $\leq 20\%$ ) показателем Ki-67 при границе деления опухолей на высоко- и низкоэкспрессирующие ERβ по уровню показателя 40% ( $p = 0,8$ ).

Однако при использовании границы деления на группы с низким и высоким уровнем экспрессии ERβ показателя 50%, выявлены отличия в экспрессии ERβ между прогностически благоприятной и неблагоприятной группами — Ki-67  $\leq 20\%$  vs Ki-67  $> 20\%$ , соответственно. Высокая экспрессия ERβ (выше 50%) в 1,4 раза чаще выявлялась в группе при экспрессии Ki-67  $> 20\%$  по сравнению с Ki-67  $\leq 20\%$  (82% vs 59%,  $p = 0,02$ ).

Более выразительной была разница при сравнении частоты экспрессии ERβ  $\geq 50\%$  в группах с разным уровнем экспрессии Ki-67. Высокая



**Рис. 4.** Частота встречаемости разных уровней экспрессии ERβ в группах с разным уровнем Ki-67.

**Примечание.** Тёмные сегменты — опухоли с низкой экспрессией ERβ; светлые сегменты — опухоли с высокой экспрессией ERβ. Ki-67 ≤ 20% — благоприятный; Ki-67 > 20% — неблагоприятный прогноз РМЖ.

**Fig. 4.** Frequency of occurrence of different ERβ expression levels in groups with different Ki-67 percentage score.

**Note.** Dark and light segments — tumors with low and high ERβ expression respectively; Ki-67 ≤ 20% and > 20% — good and poor prognosis of breast cancer respectively.

экспрессия ERβ в 2,3 раза чаще выявлялась в прогностически благоприятной группе по показателю уровня экспрессии Ki-67, чем в неблагоприятной (41% vs 18%,  $p=0,02$ ).

## Заключение

Таким образом, при количественном иммунофлуоресцентном анализе с использованием проточной цитометрии экспрессия ERβ выявлена во всех исследованных образцах рака молочной железы, при этом у разных больших тканей опухоли значительно отличается как по уровню экспрессии ERβ, так и Ki-67.

Полученные результаты с высокой степенью статистической значимости показали, что прогностически информативной следует признать границу деления опухолей по уровню экспрессии ERβ, равному 50%. При этом опухоли с высоким уровнем экспрессии ERβ в 1,4 раза чаще встречались в группе с неблагоприятным по сравнению с благоприятным прогнозом течения болезни в соответствии с показателем экспрессии в опухоли маркера пролиферативной активности Ki-67. Противоположная зависимость выявлена в группе благоприятного прогноза с экспрессией Ki-67 < 20%: опухолей с показателем ERβ ≥ 50% ока-

зались в 2,3 раза больше. В совокупности, эти данные показывают, что уровень экспрессии ERβ ≥ 50% в опухоли может рассматриваться как фактор благоприятного прогноза агрессивности течения рака молочной железы.

При статистическом корреляционном анализе установлено, что в изучаемой выборке рака молочной железы отсутствует ассоциация между экспрессией ERβ и Ki-67, что может указывать на их независимую прогностическую значимость как опухолевых маркеров и на отсутствие общих механизмов регуляции.

Применённый в настоящем исследовании подход к оценке прогностической значимости экспрессии ERβ, основанный на сравнении частоты встречаемости высокого и низкого уровня показателя в группах благоприятного и неблагоприятного

прогноза в соответствии с пролиферативной активностью опухоли, оцененного на основании рутинно используемого молекулярного маркера Ki-67, может быть использован и при изучении опухолей других локализаций в случае значительной продолжительности жизни пациентов и невозможности точной оценки течения болезни для анализа выживаемости.

**Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение о субсидии № 075-15-2021-1060 от 28.09.2021 года (сбор и подготовка для анализа образцов опухолей; создание клинической базы данных; оценка опухолевых маркеров; статистический анализ результатов; написание и оформление статьи), и в рамках НИР ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России 2023–2025 года, рег. № 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2 (предоставление хирургических образцов опухолей и клиничко-морфологических данных о пациентах, включенных в исследование).**

### Дополнительная информация

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

**Соблюдение этических стандартов.** Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике

и Хельсинкской декларации 1964 г. и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. У всех пациенток получено письменное информированное согласие.

## Литература/References

1. Smolarz B., Nowak A.Z., Romanowicz H. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers* (Basel). 2022; 14 (10): 2569. doi: 10.3390/cancers14102569.
2. Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жукова Л.Г., Кислов Н.В., Королева И.А., Пароконная А.А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. 2022; 12 (3s2): 155–197. doi: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-155-197>. [Tyulyandin S.A., Artamonova E.V., Zhukova L.G., Kislov N.V., Koroleva I.A., Parokonnaya A.A. i dr. Prakticheskie rekomendatsii po lekarstvennomu lecheniyu raka molochnoi zhelezy. Zlokachestvennye opukholi: Prakticheskie Rekomendatsii RUSSCO. 2022; 12 (3s2): 155–197. doi: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-155-197>. (in Russian)]
3. Kuiper G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93 (12): 5925–5930. doi: 10.1073/pnas.93.12.5925.
4. Božović A., Mandušić V., Todorović L., Krajnović M. Estrogen receptor beta: the promising biomarker and potential target in metastases. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (4): 1656. doi: 10.3390/ijms22041656.
5. Nilsson S., Mäkelä S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G. et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001; 81 (4): 1535–1565. doi: 10.1152/physrev.2001.81.4.1535.
6. Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007; 87 (3): 905–931. doi: 10.1152/physrev.00026.2006.
7. Warner M., Fan X., Strom A., Wu W., Gustafsson J.Å. 25 years of ERβ: a personal journey. *J Mol Endocrinol*. 2021; 68 (1): R1–R9. doi: 10.1530/JME-21-0121.
8. Udovicic-Gagula D., Ahmovic A., Bilalovic N., Doric M. Expression of Ki-67 and estrogen receptor beta in primary cutaneous melanoma as a potential indicator of regional lymph node positivity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019; 27 (1): 27–32. doi: 10.1097/PAL.0000000000000530.
9. Grover S.K., Agarwal S., Gupta S., Wadhwa N., Sharma N. Expression of estrogen receptor β and Ki 67 in benign & malignant human prostate lesions by immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res*. 2015; 21 (3): 651–657. doi: 10.1007/s12253-014-9870-y.
10. Fujimura T., Takahashi S., Urano T., Ogawa S., Ouchi Y., Kitamura T. et al. Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal truncated splice variant ERbetacx as prognostic predictors in human prostatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289 (3): 692–699. doi: 10.1006/bbrc.2001.6038.
11. Ström A., Hartman J., Foster J.S., Kietz S., Wimalasena J., Gustafsson J.A. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 23; 103 (21): 8298. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101 (6): 1566–1571. doi: 10.1073/pnas.0308319100.
12. Thomas C., Gustafsson J.Å. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11 (8): 597–608. doi: 10.1038/nrc3093.
13. Tan W., Li Q., Chen K., Su F., Song E., Gong C. Estrogen receptor beta as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016; 7 (9): 10373–10385. doi: 10.18632/oncotarget.7219.
14. Mann S., Laucirica R., Carlson N., Younes P.S., Ali N., Younes A. et al. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 2001; 32 (1): 113–118. doi: 10.1053/hupa.2001.21506.
15. Nakopoulou L., Lazaris A.C., Panayotopoulou E.G., Giannopoulou I., Givalos N., Markaki S. et al. The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2004; 57 (5): 523–528. doi: 10.1136/jcp.2003.008599.
16. Maehle B.O., Collett K., Tretli S., Akslen L.A., Grotmol T. Estrogen receptor beta — an independent prognostic marker in estrogen receptor alpha and progesterone receptor-positive breast cancer? *APMIS*. 2009; 117 (9): 644–650. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02510.x.
17. Zhang H., Zhang Z., Xuan L., Zheng S., Guo L., Zhan Q. et al. Evaluation of ER-α, ER-B1 and ER-B2 expression and correlation with clinicopathologic factors in invasive luminal subtype breast cancers. *Clin Transl Oncol*. 2012; 14 (3): 225–231. doi: 10.1007/s12094-012-0788-0.
18. Liu J., Guo H., Mao K., Zhang K., Deng H., Liu Q. Impact of estrogen receptor-β expression on breast cancer prognosis: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2016; 156 (1): 149–162. doi: 10.1007/s10549-016-3721-3.
19. Guo L., Zhu Q., Yilamu D., Jakulin A., Liu S., Liang T. Expression and prognostic value of estrogen receptor beta in breast cancer patients. *Internt J Clin Exp Med*. 2014; 7 (10): 3730–3736.
20. Guo L., Zhu Q., Aisimutuola M., Yilamu D., Liu S., Jakulin A. Expression and prognostic value of estrogen receptor β in patients with triple-negative and triple-positive breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015; 9 (6): 2147–2150. doi: 10.3892/etm.2015.2380.
21. Guo L., Zhang Y.U., Yilamu D., Liu S., Guo C. ERβ overexpression results in endocrine therapy resistance and poor prognosis in postmenopausal ERα-positive breast cancer patients. *Oncology letters*. 2016; 11 (2): 1531–1536. doi: 10.3892/ol.2016.4095.
22. Zhou Y., Liu X. The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomark Res*. 2020; 8 (39). doi: 10.1186/s40364-020-00223-2.
23. Hammond M.E., Hayes D. F., Dowsett M., Allred D.C., Hagerty K.L., Badve S. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (21): 3543. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (16): 2784–2795. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6529.
24. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182 (3): 311–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311: AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
25. de Azambuja E., Cardoso F., de Castro G., Jr Colozza M., Mano M.S., Durbecq V. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007; 96 (10): 1504–1513. doi: 10.1038/sj.bjc.6603756.
26. Luporsi E., André F., Spyrtos F., Martin P.M., Jacquemier J., Penault-Llorca F. et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 132 (3): 895–915. doi: 10.1007/s10549-011-1837-z.
27. Bogush T.A., Basharina A.A., Eliseeva B.K., Kaliuzhny S.A., Bogush E.A., Kirsanov V.Y. et al. A new approach to epithelial-mesenchymal transition diagnostics in epithelial tumors: double immunofluorescent staining and flow cytometry. *Biotechniques*. 2020; 69 (4): 257–263. doi: 10.2144/btn-2020-0024.

## Информация об авторах

<sup>#</sup>Богущ Татьяна Анатольевна — д. б. н., профессор, руководитель группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ ЭДИТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-7673-4284. ResearcherID: A-6522-2013. eLIBRARY SPIN-код: 4050-0061. Scopus Author ID: 7006161773

## About the authors

<sup>#</sup>Tatiana A. Bogush — D. Sc. in Biology, Professor, Head of the Molecular Tumor Prognosis Group of the Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics and Personalized Medicine, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-7673-4284. ResearcherID: A-6522-2013. eLIBRARY SPIN: 4050-0061. Scopus Author ID: 7006161773

<sup>#</sup> — авторы внесли равный вклад в опубликованную статью.

<sup>#</sup> — contributed equally to this work.

*#Поцелуева Полина Денисовна* — студентка факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова; лаборант-исследователь группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-3777-2920. ResearcherID: AAG-7679-2022

*Щербakov Александр Михайлович* — к. б. н., старший научный сотрудник, исполняющий обязанности заведующего лаборатории онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-2974-9555. ResearcherID: F-4914-2013. Scopus Author ID: 7003636718

*Богущ Елена Александровна* — к. м. н., ассистент кафедры онкологии Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-5601-3669. ResearcherID: K-8488-2018. Scopus Author ID: 57193509054

*Равчеева Анна Борисовна* — к. б. н., младший научный сотрудник группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-5969-0219. ResearcherID: R-9724-2019. Scopus Author ID: 7801332514

*Вихлянцев Надежда Олеговна* — младший научный сотрудник группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-1372-2980. ResearcherID: S-1111-2019. Scopus Author ID: 6504200920

*Косоруков Вячеслав Станиславович* — к. б. н., заведующий лабораторией трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-8462-2178. ResearcherID: A-3901-2014. eLIBRARY SPIN-код: 3656-4029. Scopus Author ID: 6505962801

*#Polina D. Potselueva* — Student of the Faculty of Fundamental Medicine of M. V. Lomonosov Moscow State University; Laboratory assistant-researcher of the molecular tumor Prognosis group of the Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics and Personalized Medicine, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N. N. Blokhin National Research Institute of Oncology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-3777-2920. ResearcherID: AAG-7679-2022

*Alexander M. Scherbakov* — Ph. D. in Biology, Senior Researcher, Acting Head of the Oncoproteomics Laboratory of the Department of Experimental Tumor Biology, N.N. Blokhin National Research Institute of Oncology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2974-9555. ResearcherID: F-4914-2013. Scopus Author ID: 7003636718

*Elena A. Bogush* — Ph. D. in Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-5601-3669. ResearcherID: K-8488-2018. Scopus Author ID: 57193509054

*Anna B. Ravcheeva* — Ph. D. in Biology, Junior Researcher of the Molecular Tumor Prognosis Group of the Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics and Personalized Medicine, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Research Institute of Oncology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-5969-0219. ResearcherID: R-9724-2019. Scopus Author ID: 7801332514

*Nadezhda O. Vikhlyantseva* — Junior Researcher of the Molecular Tumor Prognosis Group of the Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics and Personalized Medicine, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Research Institute of Oncology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-1372-2980. ResearcherID: S-1111-2019. Scopus Author ID: 6504200920

*Vyacheslav S. Kosorukov* — Ph. D. in Biology, Head of the Laboratory of transgenic Drugs, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-8462-2178. ResearcherID: A-3901-2014. eLIBRARY SPIN: 3656-4029. Scopus Author ID: 6505962801

# — авторы внесли равный вклад в опубликованную статью.

# — contributed equally to this work.

## Клинико-лабораторная характеристика больных с COVID-19 на фоне сердечно-сосудистых заболеваний

\*З. А. КАМБАЧОКОВА, З. А. АХКУБЕКОВА, Р. М. АРАМИСОВА, Д. Е. АЛЬТУДОВА, Л. А. КАГАЗЕЖЕВА, М. А. ШОКУЕВА, А. А. КАМБАЧОКОВА, А. Б. КАНКУЛОВА, А. М. УРУСБИЕВ, ЮСУФЗАЙ АБДУЛ ВАДЖИД, И. А. КОЧЕСОКОВА

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

## Clinical and Laboratory Characteristics of Patients with COVID-19 on the Background of Cardiovascular Diseases

\*ZARETA A. KAMBACHOKOVA, ZUKHRA A. AKHKUBEKOVA, RINA M. ARAMISOVA, DARINA E. ALTUDOVA, LYANA A. KAGAZHEVA, MILANA A. SHOKUEVA, AMINA A. KAMBACHOKOVA, ALINA B. KANKULOVA, ASTEMIR M. URUSBIEV, YUSUFZAI ABDUL VADZHID, IRINA A. KOCHESOKOVA

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

### Резюме

В исследовании изучалась клинико-лабораторная характеристика больных COVID-19 на фоне сердечно-сосудистых заболеваний. Выявлена высокая распространённость сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) среди больных COVID-19: артериальная гипертензия (93,4%), хроническая сердечная недостаточность (60,9%), аритмии сердца (40,1%), ишемическая болезнь сердца (21,9%). Установлена достоверная корреляция между сроками госпитализации от начала заболевания и тяжестью течения инфекции, смертность была выше у лиц, госпитализированных на 5–7-й день болезни (59,8%). У пациентов с ССЗ достоверно чаще развиваются осложнения, а также выше смертные случаи (11,53% против 4,30%). В структуре причин смерти преобладали тромбоэмболия лёгочной артерии (44%), острый респираторный дистресс-синдром (22%), острое повреждение почек (20,6%). Обнаружены гендерные различия по течению и исходам COVID-19: тяжесть течения и показатели смертности были выше среди лиц мужского пола. По данным клинико-лабораторных показателей, у больных с заболеваниями сердечно-сосудистой системы наблюдалось более тяжёлое течение и высокая степень иммуновоспалительных реакций по сравнению с группой пациентов без преморбидного фона. При поступлении в госпиталь у пациентов с COVID-19 и ССЗ достоверно чаще регистрировались поражение лёгочной паренхимы уровня КТ 3 и КТ 4 ( $p < 0,05$ ), тогда как в группе без сопутствующей кардиальной патологией поражение лёгких соответствовало КТ 1 ( $p < 0,05$ ); КТ лёгких в динамике показала различия в группах исследования: у пациентов COVID-19 и ССЗ КТ 3 регистрировалась достоверно чаще, а в группе сравнения — КТ 1 (45% против 10%, ( $p < 0,05$ )).

**Ключевые слова:** новая коронавирусная инфекция; сердечно-сосудистые заболевания; клинико-лабораторные показатели

**Для цитирования:** Камбачокова З. А., Ахкубекова З. А., Арамисова Р. М., Альтудова Д. Е., Кагазежева Л. А., Шокуева М. А., Камбачокова А. А., Канкулова А. Б., Урусбиев А. М., Юсуфзай Абдул Ваджид, Кочесокова И. А. Клинико-лабораторная характеристика больных с COVID-19 на фоне сердечно-сосудистых заболеваний. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 46–51. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-46-51>.

### Abstract

The research studied the clinical and laboratory characteristics of COVID-19 patients against the background of cardiovascular diseases. A high prevalence of cardiovascular diseases (CVD) was revealed among COVID-19 patients: arterial hypertension (93.4%), chronic heart failure (60.9%), cardiac arrhythmias (40.1%), coronary heart disease (21.9%). A reliable correlation was established between the timing of hospitalization from the onset of the disease and the severity of the infection, mortality was higher in persons hospitalized on the 5–7 day of the disease (59.8%). Patients with CVD are significantly more likely to develop complications, as well as higher deaths (11.53% vs. 4.30%). Pulmonary embolism (44%), acute respiratory distress syndrome (22%), acute kidney injury (20.6%) prevailed in the structure of causes of death. Gender differences in the course and outcomes of COVID-19 were found: the severity of the course and mortality rates were higher among males. According to clinical and laboratory indicators, patients with diseases of the cardiovascular system had a more severe course and a high degree of immuno-inflammatory reactions compared with the group of patients without a premorbid background. Upon admission to the hospital, patients with COVID-19 and CVD were significantly more likely to have a lesion of

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: ул. Чернышевского, д. 173, г. Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, Россия, 360004. E-mail: tatbogush@mail.ru

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 173 Chernyshevskogo st., Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, 360004 Russia. E-mail: k.zareta.7@mail.ru

the pulmonary parenchyma of CT 3 and CT 4 ( $P<0.05$ ), whereas in the group without concomitant cardiac pathology, lung lesion corresponded to CT 1 ( $P<0.05$ ); CT of the lungs in dynamics showed differences in the study groups: in patients with COVID-19 and CVD, CT 3 was recorded significantly more often, and in the comparison group — CT 1 (45% vs. 10%, ( $P<0.05$ )).

**Key words:** new coronavirus infection; cardiovascular diseases; clinical and laboratory indicators

**For citation:** Kambachokova Z. A., Akhkubekova Z. A., Aramisova R. M., Altudova D. E., Kagazheva L. A., Shokueva M. A., Kambachokova A. A., Kankulova A. B., Urusbiev A. M., Yusufzai AbdulVadzhid, Kochesokova I. A. Clinical and laboratory characteristics of patients with COVID-19 on the background of cardiovascular diseases. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 46–51. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-46-51>.

## Актуальность проблемы

Коронавирусная инфекция стала причиной значительного роста заболеваемости и смертности больных с сердечно-сосудистыми (ССЗ) [1, 2]. Заболевания сердечно-сосудистой системы у больных с коронавирусной инфекцией могут быть как фоновыми заболеваниями, так и обусловлены поражением вирусом SARS-CoV-2. Результаты многочисленных наблюдений показали, что ССЗ являются распространённой коморбидной патологией в условиях вирусной пандемии, встречаются у каждого третьего пациента. Показатели смертности среди пациентов с COVID-19 на фоне ССЗ в 3–4 раза выше уровня летальности среди пациентов без сопутствующих заболеваний [3–6].

Повышение эффективности оказания медицинской помощи больным COVID-19 на современном этапе является одной из важных задач системы здравоохранения. В настоящее время продолжается изучение клинических и эпидемиологических особенностей заболевания, разработка новых методов профилактики и лечения. На основе полученных данных исследований рекомендации по диагностике и лечению инфекции всё время обновляются, в 2022 г. издана уже 17-я версия. В этой связи изучение клинико-лабораторных особенностей течения COVID-19 у пациентов с ССЗ представляет важный научный и практический интерес.

*Цель исследования* — выявление клинико-лабораторных особенностей COVID-19 у госпитализированных больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

## Материал и методы

Под наблюдением находились 182 пациента (46,4% мужчин и 53,6% женщин) с ССЗ (группа 1), госпитализированных в госпиталь особо опасных инфекций № 2 на базе городской клинической больницы №1 (г. Нальчик) с диагнозом: новая коронавирусная инфекция COVID-19. Средний возраст мужчин составил  $62,61 \pm 0,85$ , женщин —  $64,21 \pm 1,34$ . От всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Исследование было сплошным, в него включались все пациенты, соответствующие критериям включения при отсутствии критериев невключения. Также в исследование были включены 182 пациента (группа 2), находившихся в госпитале с новой коронавирусной инфекцией без сопутствующей кардиальной патологии (группа сравнения), сопоставимая по полу и возрасту.

Клинико-лабораторное обследование проводилось в соответствии с временными рекомендациями «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» с помощью стандартных методик. Всем пациентам проводилось определение в образцах сыворотки крови различных параметров: электролитов (K, Na, Ca), тропонина Т, креатинина, мочевины, мочевой кислоты, общего белка, альбумина, билирубина, трансаминаз (АЛТ, АСТ, ЩФ), прокальцитонина, ферритина, глюкозы, фракций холестерина, СРБ, группу крови и резус-фактора, проводили этаноловый тест. Также определяли уровень D-димера, протромбиновое время, фибриноген, АЧТВ, количество тромбоцитов, с последующим регулярным контролем этих показателей. Проводилось исследование крови на ВИЧ, сифилис, гепатиты В и С. Кратность мониторингования: у госпитализированных больных при легком течении 1 раз в 4–5 дней, при течении средней тяжести 1 раз в два дня; при тяжелом течении ежедневно; внеочередной анализ — при углублении тяжести по COVID-19.

Инструментальная диагностика включала пульсоксиметрию с измерением  $SpO_2$  для выявления дыхательной недостаточности (ДН) и оценки выраженности гипоксемии, а также компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки. Степень тяжести пневмоний устанавливалась при проведении КТ в соответствии с принятой градацией по объёму поражения лёгочной ткани. Компьютерная томография лёгких проводилась во всех случаях пациентов с подозрением на инфицирование и у пациентов с подтверждённой COVID-19 при поступлении и в динамике на аппарате «ACTIVION 16-TS».

Всем пациентам при поступлении в госпиталь выполнялась базовая ЭКГ в 12 отведениях. Трансторакальная ЭхоКГ проводилась по показаниям.

Для комплексной оценки суммарной тяжести соматической патологии определялся индекс коморбидности Charlson.

Лечение новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, проводили согласно временным рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» (версии 16–17).

Ретроспективно проведён анализ 150 (31,4%) электронных историй болезней с летальным исходом ( $n=477$ ) методом случайной выборки.

Статистический анализ результатов проводился с использованием программ IBM SPSS Statistics 24 (IBM, США) и Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США). Сравнение двух групп при анализе показателей, измеряемых по количественной шкале и имеющих нормальное распределение, осуществлялось с применением параметрического  $t$ -критерия Стьюдента для независимых групп.

## Результаты исследования

Среднетяжёлое течение отмечалось у 32,1%, тяжёлое — 58,4% и крайне тяжёлое — 9,4% больных. Была выявлена прямая зависимость тяжести течения коронавирусной инфекции от сроков госпитализации больного.



**Сравнительный анализ показателей свёртывающей системы крови в группах исследования**  
**Comparative analysis of indicators of the blood coagulation system in the study groups**

Показатели	1-я группа	2-я группа	<i>p</i>
ПТИ	94,5±4,8	92,7±1,1	
МНО	1,2±0,03	3,5±1,4	<0,05
АЧТВ	27,4±0,7	23,9±0,6	
D-димер	341,3±45,8	80,8±26,1	<0,05
Фибриноген	519,9±24,3	526,5±19,3	

**Примечание.** ПТИ — протромбиновый индекс; МНО — международное нормализованное отношение; АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время.

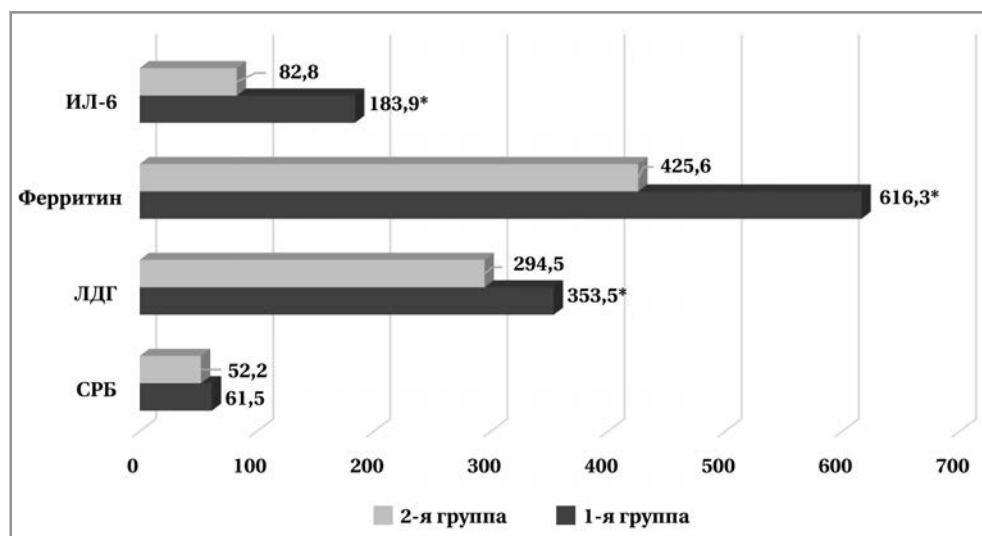
**Note.** PTI — prothrombin index; INR — international normalized ratio; APTT — activated partial thromboplastin time.

Анализ частоты и структуры ССЗ среди больных коронавирусной инфекцией COVID-19 показал, что распространёнными сопутствующими заболеваниями были артериальная гипертензия (93,4%), хроническая сердечная недостаточность (60,9%), аритмии сердца (40,1%) ишемическая болезнь сердца (21,9%).

У пациентов с тяжёлой и крайне тяжёлой степенью тяжести COVID-19 отмечается повышение уровня СРБ больше 7 норм, ЛДГ при тяжёлом течении в 1,5 раза больше нормы, при крайне тяжёлом в два раза больше нормы, когда при средней тяжести ЛДГ в рамках референсных значений. Ферритин при тяжёлой степени больше 2,5 норм, при крайне тяжёлом течении больше 4 норм. ИЛ-6 при тяжёлом течении больше 10 норм, при крайне тяжёлом больше 20 норм, при среднетяжёлом течении больше 18 норм. Отмечается значимое повышение D-димера больше 5 норм при крайне тяжёлом течении и трёх норм при тяжёлом течении, когда при средней степени тяжести D-димер ближе к нормальным значениям (таблица).

Сравнительный анализ маркеров воспаления в исследуемых группах показал, что у больных 1-й группы все изучаемые маркеры воспаления были выше: ИЛ-6 больше 18 норм, ферритин больше 3 норм, ЛДГ больше в 0,5 раз, а также прокальцитонин (10,4 против 3,9%) достоверно выше в группе с ССЗ (рисунок).

Достоверные отличия параметров коагулограммы в исследуемых группах отмечены в отношении D-димера. Обращает на себя внимание



**Лабораторные показатели в исследуемых группах**

**Примечание.** \* — статистически значимые различия, *p*<0,05).

**Laboratory parameters in the study groups**

**Note.** \* — statistically significant differences, *P*<0.05)

повышение уровня МНО в группе без ССЗ, вероятно, обусловленное антикоагулянтной терапией применяемой в условиях стационара у пациентов средней и тяжелой степенью тяжести COVID-19.

Достоверные отличия параметров коагулограммы в исследуемых группах отмечены в отношении D-димера, который является предиктором тромбозмболических осложнений. Сравнительный анализ уровня маркеров воспаления выявил достоверные различия в группах исследования: у больных с ССЗ все изучаемые маркеры воспаления были выше. КТ 1 достоверно чаще встречалось в группе сравнения 45% против 10% (*p*<0,05). КТ 2 и КТ 4 без значимой достоверной разницы в группах исследования.

КТ лёгких в динамике имела достоверное ухудшение у больных с ССЗ, по сравнению с контрольной группой больных (у пациентов с ССЗ КТ 3 в 25%, в группе сравнения 3 % случаев (*p*<0,05)).

У пациентов с ССЗ достоверно чаще развиваются осложнения, а также выше смертные слу-

чаи (11,53% против 4,30%). Результаты исследования показали, что у больных 1-й группы достоверно чаще наблюдались более тяжёлые осложнения по сравнению с таковыми во 2-й группе. Нарушения проводимости и ДН 3 ст. наблюдались в 3 раза чаще у больных 1-й группы, ТЭЛА — более чем в 5 раз, ИМ — в 3 раза, сепсис — в 4 раза.

В структуре осложнений наибольший удельный вес имели: ТЭЛА (47,3%), ОРДС (29,3%), ОПП (21,3%), сепсис 14,6%, гидроперикард (14%). А в структуре причин смерти: ДН 3 ст., ТЭЛА, ОРДС, ОПП и сепсис.

Смертность была выше в группе больных, поступивших в госпиталь на 5–7-й день болезни (59,8%). На втором месте по смертности оказалась группа пациентов, поступивших на 8-й и более дней заболевания (47,6%). Благоприятное течение отмечалось среди пациентов, поступивших в более ранние сроки болезни.

У пациентов с летальным исходом ССЗ встречались в преобладающем большинстве и составили 82%. В исследуемой группе умерших от COVID-19 женщин было 66 человек (44%), мужчин 84 человек (56%). Средний возраст составил у мужчин 64,4 и 66,2 у женщин. В возрастной структуре умерших в молодом и среднем возрасте преобладали лица мужского пола. В возрастной группе пожилых пациентов женщины и мужчины встречались одинаково часто. В старческом возрасте преобладали лица женского пола.

Структура сопутствующих заболеваний у пациентов с летальным исходом следующая: АГ в анамнезе в 77,3% случаев; АГ в сочетании с СД и ХБП — в 24,7%, АГ+ХСН+ФП в 38%; АГ+ИБС — в 14%, ИБС+ХСН — в 6% случаев.

При сравнительном анализе осложнений среди больных с летальным исходом выявлено, что у пациентов с ССЗ достоверно чаще наблюдались такие осложнения, как ТЭЛА — в 52% против 25,9%, ОРДС — 32,5% в первой против 7,4% во второй группе, нарушение проводимости сердца — в 40,7% против 25,9%, ИМ — в 9,8% против 3,7%, гидроперикард — в 15,4% против 7,4%, а сепсис, ОПП, миокардит регистрировались с одинаковой частотой.

Коморбидный статус был достоверно выше у больных 1-й группы по сравнению с контрольной группой. В группе больных с ССЗ наиболее часто встречались СД 2 типа (21,4%), избыточная масса тела различной степени (12,6%). Обращает внимание и высокая частота хронической болезни почек на фоне АГ и СД. Индекс коморбидности у пациентов с ССЗ больше 6, когда у пациентов без ССЗ он равен либо меньше 4.

У пациентов с преморбидным фоном из трёх заболеваний отмечается выраженное повышение маркеров воспаления и D-димера. Особенно у больных с АГ+ФП+ХСН (ЛДГ больше 2 норм, фер-

ритин больше 3,5 норм, ИЛ-6 больше 26 норм, D-димер больше 5 норм.

С учётом полученных данных произведён многофакторный корреляционный анализ клинико-лабораторных показателей, сроков госпитализации, изменений на КТ ОГК, а также по исходам инфекции у пациентов с артериальной гипертензией в сочетании с фибрилляцией предсердий и хронической сердечной недостаточностью.

Выявлена положительная корреляция у пациентов старше 70 лет с преморбидным фоном в виде АГ в сочетании с фибрилляцией предсердий и ХСН между уровнем маркеров воспаления ( $r = -0,39$ – $-0,64$ ); и D-димера ( $r = -0,64$ ) с поражением нижних дыхательных путей ( $r = -0,64$ ) с летальным исходом ( $r = -0,36$ – $-0,59$ ). Установлена достоверная корреляция между сроками госпитализации от начала заболевания и тяжестью течения инфекции, смертность была выше у лиц, госпитализированных на 7-й день заболевания ( $r = -0,44$ ).

Можно сделать вывод, что пациенты старше 70 лет с преморбидным фоном в виде АГ+ФП+ХСН являются группой повышенного риска по неблагоприятному течению инфекции, которые требуют своевременной госпитализации и повышенного внимания на стационарном этапе ведения пациентов.

В структуре больных преобладали женский пол. Достоверных различий по возрасту, температуре тела, сатурации, ЧДД, койко-дням среди мужчин и женщин не было. Показатели маркеров воспаления (СРБ, ферритин, ИЛ-6 и D-димер) были выше у мужчин. Достоверное ухудшение по показателям КТ лёгких отмечалось также среди лиц мужского пола.

По количеству осложнений преобладали женщины, исходы были тяжелее среди мужчин: улучшение — 34,0% среди мужчин, 50,9% — среди женщин; летальность среди мужчин — 5,5%, среди женщин — 2,3%.

Таким образом, выявлены гендерные различия по течению и исходам COVID-19 с более тяжёлым течением и более высокой смертностью среди лиц мужского пола. В исследуемой группе умерших от COVID-19 женщин было 66 (44%), мужчин 84 (56%). Средний возраст составил у мужчин 64,4 и 66,2 у женщин.

По результатам нашего исследования тяжесть течения заболевания зависела от группы крови. Тяжёлое течение и летальность чаще отмечались у больных со 2-й группой крови.

## Заключение

Учёт полученных результатов, свидетельствующих о наличии особенностей течения COVID-19, позволит оптимизировать тактику оказания медицинской помощи больным COVID-19

и сердечно-сосудистых заболеваний как на госпитальном этапе, так и на этапе постковидной реабилитации.

## Выводы

1. Выявлена высокая распространённость ССЗ у больных COVID-19: АГ — 93,4%, ХСН — 60,9%, аритмии сердца — 40%, ИБС — 22% случаев.

2. У пациентов с тяжёлой и крайне тяжёлой степенью тяжести отмечается повышение уровня СРБ больше 7 норм, ЛДГ — больше нормы; ферритин — больше 2,5 норм; ИЛ-6 — больше 20 норм, D-димера — больше 5 норм.

3. Выявлено, что у пациентов с ССЗ достоверно выше маркеры воспаления чем в контроль-

ной группе (ИЛ-6 больше 18 норм, ферритин больше 3 норм, а также прокальцитонин (10,4% против 3,9%).

4. Индекс коморбидности у пациентов с ССЗ больше 6, тогда как у пациентов без ССЗ он был не более 4.

5. Летальность от COVID-19 среди больных с ССЗ была выше по сравнению со 2-й группой.

6. Установлена достоверная корреляция между сроками госпитализации от начала заболевания и тяжестью течения инфекции.

7. Обнаружены гендерные различия в течении инфекции: тяжесть течения и смертность были выше среди мужчин.

## Литература/References

1. Баздырев Е.Д. Коронавирусная инфекция — актуальная проблема XXI века. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2020; 9 (2): 6–16. [Bazdyrev E.D. Koronavirusnaya infektsiya — aktual'naya problema XXI veka. Kompleksnyye Problemy Serdechno-Sosudistykh Zabolevanij. 2020; 9 (2): 6–16. (in Russian)]
2. Барбараш О.Л., Каретникова В.Н., Кашталап В.В. и др. Новая коронавирусная болезнь (сovid-19) и сердечно-сосудистые заболевания. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2020; 9 (2): 17–28. [Barbarash O.L., Karetnikova V.N., Kashtalap V.V. i dr. Novaya koronavirusnaya bolezn' (covid-19) i serdechno-sosudistye zabolevaniya. Kompleksnyye problemy Serdechno-Sosudistykh Zabolevanij. 2020; 9 (2): 17–28. (in Russian)]
3. Воробьева А.В., Ласточкин О.В. Патоморфологические изменения в органах при COVID-19. Инфекция и иммунитет. 2020; 10 (3): 587–590. [Vorob'eva A.V., Lastochkin O.V. Patomorfologicheskie izmeneniya

v organakh pri COVID-19. Infektsiya i Immunitet. 2020; 10 (3): 587–590. (in Russian)]

4. Гриневич В.Б., Губонина И.В., Доцицин В.Л. и др. Особенности ведения коморбидных пациентов в период пандемии новой коронавирусной инфекции (сovid-19). Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2020; 19 (4): 135–172. [Grinevich V.B., Gubonina I.V., Doshchitsin V.L. i dr. Osobennosti vedeniya komorbidnykh patsientov v period pandemii novoy koronavirusnoj infektsii (covid-19). Kardiovaskulyarnaya Terapiya i Profilaktika. 2020; 19 (4): 135–172. (in Russian)]
5. Данилова И.А. Заболеваемость и смертность от COVID-19. Проблема сопоставимости данных. Демографическое обозрение. 2020; 7: 6–26. [Danilova I.A. Zaboлеваemost' i smertnost' ot COVID-19. Problema sopostavimosti dannykh. Demograficheskoe Obozrenie. 2020; 7: 6–26. (in Russian)]
6. Козлов И.А., Тюрин А.Н. Сердечно-сосудистые осложнения COVID-19. Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2020; 17 (4): 14–22. [Kozlov I.A., Tyurin A.N. Serdechno-sosudistye oslozhneniya COVID-19. Vestnik Anestezologii i Reanimatologii. 2020; 17 (4): 14–22. (in Russian)]

## Информация об авторах

Камбачокова Зарета Анатольевна — д. м. н., профессор кафедры госпитальной терапии медицинского факультета, ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия  
Ахжубекова Зухра Азретовна — заведующая кардиологическим отделением для больных острым инфарктом миокарда, врач кардиолог ГКБ им. М. П. Кончаловского ДЗМ, Москва, Россия

Арамисова Рина Мухамедовна — д. м. м., профессор, заведующая кафедрой госпитальной терапии медицинского факультета, ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Алтудова Дарина Ерославовна — студентка 6 курса, Медицинский факультет ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Кагазеева Ляна Ахмедовна — студентка 6 курса, Медицинский факультет ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Шокуева Милана Арсеновна — студентка 5 курса, Медицинский факультет ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

Камбачокова Амина Аслановна — студентка 2 курса, Медицинский факультет ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

## About the authors

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

Zukhra A. Akhkubekova — Head of the Cardiology Department for patients with acute Myocardial infarction, Cardiologist, M. P. Konchalovsky State Clinical Hospital, Moscow, Russia

Rina M. Aramisova — D. Sc. in Medicine, Professor, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Darina E. Altudova — 6<sup>th</sup> year student of General Medicine Department, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Lyana A. Kagazheva — 6<sup>th</sup> year student of General Medicine Department, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Milana A. Shokueva — 5<sup>th</sup> year student of General Medicine Department, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

Amina A. Kambachokova — 2<sup>nd</sup> year student of General Medicine Department, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

*Канкулова Алина Беслановна* — студентка 6 курса, Медицинский факультет ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

*Урусбиев Астемир Муратович* — студент 6 курса, Медицинский факультет ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

*Юсуфзай Абдул Ваджид* — студент 6 курса, Медицинский факультет ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

*Кочесокова Ирина Ахмедовна* — врач общей практики, ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», Нальчик, Россия

*Alina B. Kankulova* — 6<sup>th</sup> year student of General Medicine Department, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

*Astemir M. Urusbiev* — 6<sup>th</sup> year student of General Medicine Department, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

*Yusufzai Abdul Vadzhid* — 6<sup>th</sup> year student of General Medicine Department, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

*Irina A. Kochesokova* — General practitioner, Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russia

# Систематический обзор с метаанализом и непрямым сравнением эффективности антиинтерлейкиновой терапии COVID-19

\*Ю. М. ГОМОН<sup>1,2</sup>, А. С. КОЛБИН<sup>1,3</sup>, А. М. ФАХРУТДИНОВА<sup>2</sup>,  
Т. А. УСМАНОВА<sup>1</sup>, Ф. М. СУЛТАНОВА<sup>2</sup>, Ю. Е. БАЛЫКИНА<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> СПб ГБУЗ «Больница Святого Великомученика Георгия», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

## A Systematic Review with Meta-Analysis and Indirect Comparison of the Effectiveness of COVID-19 Anti-Interleukin Therapy

\*YULIYA M. GOMON<sup>1,2</sup>, ALEXEY S. KOLBIN<sup>1,3</sup>, AIGUL M. FAHRUTDINOVA<sup>2</sup>,  
TATIANA A. USMANOVA<sup>1</sup>, FLORA M. SULTANOVA<sup>2</sup>, YULIA E. BALYKINA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> First St. Petersburg State Medical University named after Academician I. P. Pavlova Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Hospital of St. George the Great Martyr, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

### Резюме

**Цель исследования.** Оценка эффективности антиинтерлейкиновых лекарственных средств, используемых в рамках патогенетической терапии COVID-19 в отношении относительных рисков 28-дневной летальности и отношения шансов 14-дневного улучшения симптомов заболевания. **Материал и методы.** Проведён систематический обзор публикаций, касающихся оценки эффективности указанных лекарственных средств, рекомендованных к использованию в качестве патогенетической терапии COVID-19, с метаанализом и непрямым сравнением полученных данных. **Результаты.** В метаанализ было включено 15 рандомизированных и 8 нерандомизированных исследования. При прямом сравнении антиинтерлейкиновых ЛС с контролем было продемонстрировано, что только тоцилизумаб и анакинра превосходят стандартную терапию в отношении относительного риска 28-дневной летальности (ОР 0,85 [95% ДИ 0,74; 0,97] и 0,5 [95% ДИ 0,32; 0,80], соответственно). Также получены статистически достоверные данные в пользу эффективности левилимаба в сравнении со стандартной терапией по критерию «ОШ улучшения к 1-му дню заболевания», которое составило 2,29 [1,31; 4,01]. При непрямом сравнении тоцилизумаба и анакинры в отношении снижения ОР 28-дневной летальности последний показал большую эффективность: ОР составил 1,2 [95% ДИ 1,16; 1,25],  $p=0,0001$ . **Выводы.** Проведённый метаанализ результатов систематического обзора продемонстрировал эффективность тоцилизумаба и анакинры в отношении ОР 28-дневной летальности, а левилимаба в отношении показателя «ОШ Улучшение состояния к 14-му дню заболевания».

**Ключевые слова:** метаанализ; антиинтерлейкины; интерлейкин-6; упреждающая патогенетическая терапия

**Для цитирования:** Гомон Ю. М., Колбин А. С., Фахрутдинова А. М., Усманова Т. А., Султанова Ф. М., Балыкина Ю. Е. Систематический обзор с метаанализом и непрямым сравнением эффективности антиинтерлейкиновой терапии COVID-19. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 52–65. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-52-65>.

### Abstract

**Aim.** Evaluation of the effectiveness of anti-interleukin drugs used in the pathogenetic therapy of COVID-19 in relation to the relative risks of 28-day mortality and the odds ratio of 14-day improvement of symptoms of the disease. **Materials and methods.** A systematic review of publications concerning the evaluation of the effectiveness of these drugs recommended for use as COVID-19 pathogenetic therapy, with meta-analysis and indirect comparison of the data obtained, was carried out. **Results.** The meta-analysis included 15 randomized and 8 non-randomized studies. In direct comparison of anti-interleukin drugs with controls, it was demonstrated that only tocilizumab and anakinra surpass standard therapy in terms of the relative risk of 28-day mortality (RR 0.85 [95% CI 0.74; 0.97] and 0.5 [95% CI 0.32; 0.80], respectively). Statistically reliable data were also obtained in favor of the effectiveness of levilimab in comparison with standard therapy according to

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: ул. Льва Толстого, д. 6–8, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, г. Санкт-Петербург, Россия, 197022. E-mail: gomonmd@yandex.ru

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 6–8 Lva Tolstogo str., First St. Petersburg State Medical University named after Academician I. P. Pavlova, St. Petersburg, Russia. E-mail: gomonmd@yandex.ru

the criterion of «improvement by the 14<sup>th</sup> day of the disease», which was 2.29 [1.31; 4.01]. With an indirect comparison of tocilizumab and anakinra, the latter showed greater effectiveness in reducing the 28-day mortality rate: the RR was 1.2 [95% CI 1.16; 1.25],  $P=0.0001$ . **Conclusion.** The meta-analysis of the results of the systematic review demonstrated the effectiveness of tocilizumab and anakinra in relation to the 28-day mortality rate, and levilimab in relation to the indicator «Improvement by the 14<sup>th</sup> day of the disease».

**Keywords:** meta-analysis; anti-interleukins; interleukin-6; preventive pathogenetic therapy

**For citation:** Gomon Yu. M., Kolbin A. S., Fahrutdinova A. M., Usmanova T. A., Sultanova F. M., Balykina Yu. E. A systematic review with meta-analysis and indirect comparison of the effectiveness of COVID-19 anti-interleukin therapy. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 52–65. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-52-65>.

## Введение

Большинство случаев инфекции, вызванной SARS-CoV-2 протекают либо бессимптомно, либо приводят к лёгкой форме заболевания [1]. Однако у части пациентов требуется стационарное лечение с применением системной противовоспалительной терапии и респираторной поддержки. Гипоксическая дыхательная недостаточность у пациентов с COVID-19 (COronaVirus Disease) связана с признаками системного воспаления, включая высвобождение провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин (IL)-1, IL-6 и фактор некроза опухоли  $\alpha$ , а также повышенные концентрации D-димера, ферритина и С-реактивного белка [2, 3]. Считается, что иммунный ответ хозяина играет ключевую роль в развитии острого воспалительного пневмонического процесса с диффузным повреждением альвеол, формированием инфильтратов миелоидных клеток, микрососудистыми тромбозами [4]. Показанная эффективность глюкокортикостероидов у пациентов с тяжёлым течением COVID-19 предполагает, что и другие, более специфические иммуномодулирующие агенты, могут быть клинически эффективны [5, 6].

Согласно российским временным методическим рекомендациям по диагностике, профилактике и лечению COVID-19, в плане патогенетической упредительной терапии цитокинового шторма у пациентов с среднетяжёлым и тяжёлым течением инфекции показано введение антиинтерлейкиновых лекарственных средств (анти-IL ЛС): антагонистов рецепторов к IL-6 (тоцилизумаба, сарилумаба, левилимаба), блокаторов IL-1 (канакинумаба, анакинра), блокатора IL-6 (олокизумаба) внутривенно (табл. 1) [1]. Ва-

риативными руководствами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Национального института здоровья (National Institutes of Health, NIH) у тяжёлых и критических пациентов одобрено два ЛС данной группы (тоцилизумаб и сарилумаб) ввиду их доказанной эффективности в отношении снижения смертности, а также рисков проведения искусственной вентиляции лёгких (ИВЛ), сокращения средней длительности нахождения на ИВЛ и средней длительности госпитализации [7, 8].

Указанные в табл. 1 ЛС были зарегистрированы к применению в РФ по показанию «Лечение COVID-19» в рамках процедуры ускоренной регистрации либо применяются вне зарегистрированных показаний, а сведения об их безопасности основывались прежде всего на исследованиях их хронического применения при неинфекционных патологиях: нетакимаб — при бляшечном псориазе, анкилозирующем спондилите и псориатическом артрите; левилимаб, олокизумаб, сарилумаб — при ревматоидном артрите; тоцилизумаб — при ревматоидном артрите и системном ювенильном идиопатическом артрите; анакинра — при синдроме периодической лихорадки, криопирин-ассоциированных периодических синдромах, семейной средиземноморской лихорадке, болезни Стилла [9].

*Цель исследования* — оценка эффективности антиинтерлейкиновых лекарственных средств, используемых в рамках патогенетической терапии COVID-19.

## Материал и методы

Для достижения поставленной цели проведён систематический обзор публикаций, касающихся оценки эффектив-

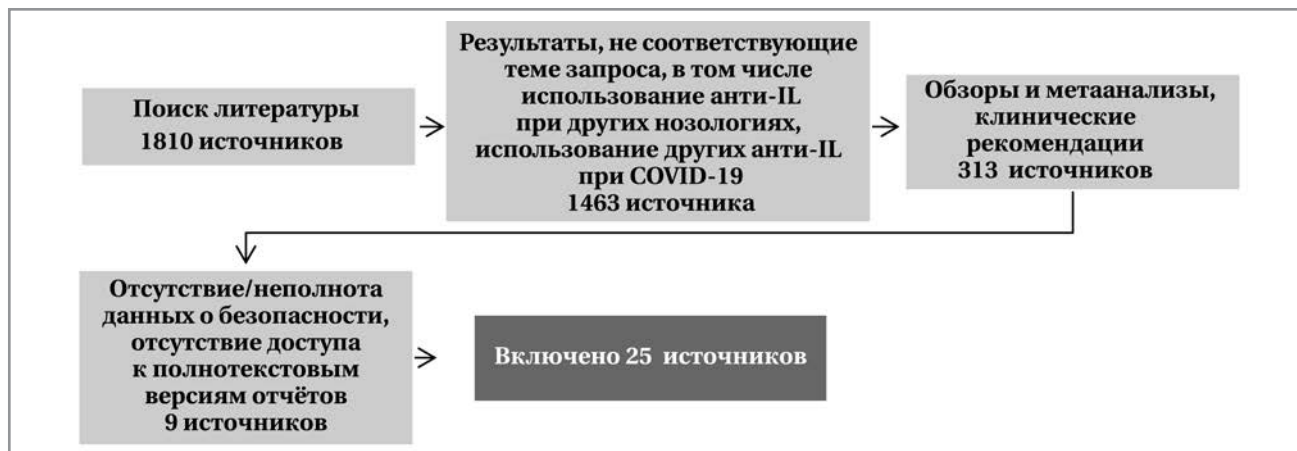
**Таблица 1.** Показания к проведению патогенетической упредительной терапии анти-IL ЛС, согласно российским временным методическим рекомендациям (версия 16.0) [1]

**Table 1.** Indications for pathogenetic preventive therapy of anti-interleukin drugs, according to the Russian temporary guidelines (version 16.0)

Лёгкое течение	
Левилимаб, олокизумаб	
Среднетяжёлое течение	
Левилимаб, олокизумаб, тоцилизумаб, сарилумаб, анакинра	+ГКС
Тяжёлое течение	
Тоцилизумаб, сарилумаб, канакинумаб, левилимаб, олокизумаб, анакинра	+ГКС

**Примечание.** ГКС — глюкокортикостероиды.

**Note.** GKS — glucocorticosteroids.



**Рис. 1.** Результаты поиска литературы по эффективности и безопасности использования антиинтерлейкиновых ЛС в лечении пациентов с COVID-19.

**Примечание.** Анти-IL — антиинтерлейкиновые лекарственные средства; COVID-19 — коронавирусная инфекция.  
**Fig. 1.** The results of a literature search on the efficacy and safety of the use of anti-IL drugs in the treatment of patients with COVID-19.

**Note.** Анти-IL — anti-interleukin drugs; COVID-19 — coronavirus infection.

ности и безопасности антиинтерлейкиновых ЛС, рекомендованных к использованию в качестве патогенетической терапии COVID-19, с метаанализом полученных данных и проведением непрямого и смешанного сравнения альтернатив. В качестве оцениваемых исходов выбраны:

1. 28-дневная летальность;
2. Улучшение состояния к 14-му дню заболевания.

Был осуществлен поиск в базах данных PubMed, Clinicaltrials.gov, eLibrary, Cyberleninka. Алгоритм поиска:

- в PubMed, Clinicaltrials.gov: [anti-interleukin therapy OR netakimab OR levilimab OR olokizumab OR tocilizumab OR sarilumab OR anakinra OR canakinumab AND COVID-19];

- в eLibrary, Cyberleninka: [упредительная патогенетическая терапия ИЛИ нетакимаб ИЛИ левилимаб ИЛИ олокизумаб ИЛИ тоцилизумаб ИЛИ сарилумаб ИЛИ анакинра ИЛИ канакинумаб И COVID-19].

Критерии включения:

1. Контролируемые исследования в популяции пациентов старше 18 лет;
2. Доступ к полнотекстовым статьям с результатами исследований;
3. Оценка в качестве исходов 28-дневной смертности; улучшения состояния к 14-му дню заболевания.

Критерии исключения:

1. Исследования другого дизайна;
2. Отсутствует детализация информации об исходах заболевания (28-дневной смертности; улучшении состояния к 14-му дню заболевания).

Два автора независимо друг от друга рассмотрели отобранные статьи, в случае наличия разногласий предполагалось привлечение третьего рецензента. Для каждой выбранной статьи извлечены сведения, касающиеся числа участников исследования, их демографические и клинические характеристики, выбранная технология сравнения, сведения о разрешённой терапии, исходах, касающихся эффективности (летальность, улучшение состояния к 14-му дню заболевания).

При оценке качества отобранных исследований использовали адаптированные опросники для оценки качества рандомизированных и нерандомизированных исследований [10, 11].

**Статистический анализ.** При проведении метаанализа использовали показатель относительного риска (relative risk

(RR), ОР), отношения шансов (odds ratio (OR), ОШ) и 95% доверительных интервалов (confidence interval (CI), ДИ) для описания дихотомических результатов (летальность, улучшение состояния к 14-му дню заболевания). Пороговое значение критерия Хи-квадрат для оценки статистической значимости результатов принято равным 0,1. Применяли модель с фиксированным эффектом, если индекс гетерогенности составлял  $I^2 < 40\%$ , и использовалась модель случайных эффектов, если значения индекса гетерогенности составляли  $I^2 > 40\%$ . С целью оценки публикационного смещения использовано построение воронкообразной диаграммы рассеяния. Статистический анализ проведён с помощью Review Manager 5.4 (Кокрановское сотрудничество) [Review Manager (RevMan) [Computer program]. Version 5.4.1, The Cochrane Collaboration, 2020.].

## Результаты

Двумя исследователями независимо друг от друга произведён поиск литературных источников в соответствии с установленными критериями включения и исключения с последующим сопоставлением полученных результатов, которые были идентичны. Результаты поиска представлены на рис. 1.

Сведения об исключённых из анализа исследованиях и причинах исключения представлены в табл. 2.

В табл. 3 приведены сведения об исследованиях, включённых в метаанализ.

В метаанализ было включено 15 рандомизированных клинических исследований (9 с уровнем доказательности ПА и 7 с уровнем доказательности ПС) и 7 нерандомизированных исследования (1 с высоким риском систематической ошибки и 6 — со средним). Исследования включали преимущественно пациентов с средне-тяжёлой и тяжёлой формой заболевания. В це-

**Таблица 2. Перечень исследований, исключённых из систематического обзора исследований**  
**Table 2. List of studies excluded from the systematic review of studies**

Автор, год	Причина не включения	Источник
Maslennikov R. et al, 2021	Нет доступа к полной версии исследования	[12]
Антонов В. Н. и др., 2020	Не представлены данные по оцениваемым исходам	[13]
NCT04370834	Включён единственный пациент	[14]
Kumar P. N. et al, 2021	Группы сравнения тоцилизумаб 4/8 мкг/кг	[15]
Zhao H. et al, 2021	Включено 26 пациентов: Фавипиравир 7; Тоцилизумаб 5; Тоцилизумаб+фавипиравир 14 Согласно протоколу исследования разрешены любые вмешательства по мнению исследователя. Число пациентов в группе тоцилизумаба, также получавших противовирусные препараты (формально также комбинированная терапия) не указано, ввиду чего понять сколько пациентов реально получали комбинированную терапию не возможно.	[16]
Wang D. et al, 2021	Нет доступа к полной версии исследования	[17]
Rodríguez-Baño J. et al, 2021, SAM-COVID-19	В группах сравнения применялись стероиды в средневисоких дозах и пульсовых дозах (т.е. в дозировках более 1 мг/кг и выше), что не соответствует терапии в других исследованиях	[18]
Huet T. et al, 2020	Пациенты из группы анакинра и группы исторического контроля не сопоставимы по клинически-значимым параметрам, в том числе по сопутствующей терапии, срокам госпитализации, сопутствующей патологии (ожирение) и терапии (антимикробная терапия)	[19]
Pontali E. et al, 2021	Имелись статистически значимые различия в частоте назначения сопутствующей терапии (азитромицин и гидроксихлорохин) в группе терапии и контроля, что могло повлиять на исходы заболевания	[20]
Mehta M. et al, 2021	Не приведены данные по рассматриваемым исходам	[21]

лом исследования были сравнимы по характеристикам включённых пациентов как по демографическим показателям, так и по клиническим характеристикам популяции пациентов, в частности частоте встречаемости сопутствующей патологии. Только 2 исследования представляли собой прямое сравнение альтернативных стратегий: исследование С. С. Бобковой и др. сравнивало тоцилизумаб с левилимабом и олокизумабом, исследование REMAP-CAP — тоцилизумаб и сарилумаб [44, 30]. В связи с чем потребовалось проведение непрямого сравнения, схема проведения которого представлена на рис. 2.

Результаты проведённого метаанализа представлены на рис. 3–5.

Результаты исследования CORIMUNI-ANA-1 были исключены из метаанализа, ввиду того, что тяжесть течения заболевания участников исследования (лёгкая–среднетяжёлая) не сопоставима с тяжестью течения заболевания у пациентов в других исследованиях (тяжёлая и крайне тяжёлая) [38].

Суммарные данные по результатам сравнения эффективности применения анти-IL ЛС у пациентов с НКИ в сравнении со стандартной терапией приведены в табл. 4.

Как видно из данных, представленных на рис. 3–5 и табл. 4, в сравнении со стандартной терапией только тоцилизумаб и анакинра продемонстрировали статистически значимое сниже-

ние относительного риска 28-дневной летальности от НКИ (ОР 0,85 [95% ДИ 0,74; 0,97] и 0,5 [95% ДИ 0,32; 0,80], соответственно). Также получены статистически достоверные данные в пользу эффективности левилимаба по критерию «ОШ улучшения к 14 дню заболевания», которое составило 2,29 [95% ДИ 1,31; 4,01] в пользу левилимаба. При этом стандартная терапия по указанному показателю была эффективнее в сравнении с тоцилизумабом: ОШ составило 1,28 [95% ДИ 1,06; 1,56] в пользу контрольной группы.

Поскольку только анакинра и тоцилизумаб продемонстрировали статистически достоверные результаты в отношении влияния на снижение относительного риска 28-дневной летальности в сравнении со стандартной терапией было проведено не прямое сравнение их эффективности, результаты которого приведены в табл. 5.

Исходя из данных, представленных в табл. 5, видно, что при не прямом сравнении тоцилизумаба и анакинра в отношении снижения ОР 28-дневной летальности последний показал большую эффективность: ОР составил 1,2 [95% ДИ 1,16; 1,25],  $p=0,0001$ .

Прямые сравнения альтернатив не доказали статистически достоверного снижения относительного риска 28-дневной летальности в сравнении с стандартной терапией [30, 44]. Тем не менее, в рамках настоящего сетевого метаанализа про-



**Таблица 3. Сведения об исследованиях эффективности применения антиинтерлейкиновых лекарственных средств в терапии новой коронавирусной инфекции, включенных в метаанализ**  
**Table 3. Information about efficacy studies of the use of anti-interleukin drugs in the treatment of new coronavirus infection included in the meta-analysis**

Название	Дизайн	Число пациентов	Характеристика популяции пациентов	Разрешённые к применению ЛС	Летальность на 28-й день	14-дневное улучшение	Источник
Lomakin N. V. et al, 2021 CORONA	Двойное слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое фазы III	204 пациента: Левелимаб — 103. Контроль — 101	Левелимаб: Возраст 58,5±12,9 лет; женщины 42%; ИМТ 28,1 [25,5–31,6], контроль: возраст 58,2 (10,8); женщины 49%; ИМТ 28,7 [25,5–31,6]	Противовирусные, антикоагулянты, ГКС сиптомагическая терапия, дозы ГКС, эквивалентные преднизолону в дозировке не более 1 мг/кг	Левелимаб: 4 из 103. Контроль: 4 из 101	Левелимаб: 65 из 103. Контроль: 44 из 103	[22]
<b>Олокизумаб</b>							
CL04041078, 2022	Двойное слепое, многоцентровое, плацебо-контролируемое, рандомизированное, в параллельных группах	372 пациента: Олокизумаб — 124. Плацебо — 124.	Возраст 59,1 (26,0–93,0); женщин 47,3%	Противовирусные, антикоагулянты, сиптомагическая терапия, дозы ГКС, эквивалентные преднизолону в дозировке не более 1 мг/кг	Олокизумаб: 9 из 124. Контроль: 6 из 124	Олокизумаб: 99 из 124. Контроль: 96 из 124	[23]
<b>Тоцилизумаб</b>							
Hermine O. et al, 2021 CORIMUNO-T0C1	Многоцентровое открытое рандомизированное исследование	131 пациента: Тоцилизумаб — 64. Контроль — 67	Среднетяжёлое и тяжёлое течение НКИ. Тоцилизумаб: возраст 64,0 (57,1–74,3); женщин 30%; ИМТ 27,9 (23,3–30,8) Контроль: возраст 63,3 (57,1–72,3); женщин 34%; ИМТ 27,4 (24,5–31,3)	Противовирусные, ГКС, сиптомагическая терапия, анти-микробные ЛС	Тоцилизумаб: 7 из 63. Контроль: 11 из 67	Тоцилизумаб: 44 из 63. Контроль: 44 из 67	[24]
Salama C. et al, 2021	Рандомизированное, двойное слепое, многоцентровое, фазы III	377 пациентов: Тоцилизумаб — 250. Контроль — 127	Среднетяжёлое и тяжёлое течение НКИ. Женщин 40,8%; возраст 55,9±14,4 лет; ИМТ 32,4±7,6	Противовирусные, ГКС, сиптомагическая терапия	Тоцилизумаб: 26 из 249. Контроль: 11 из 128	Тоцилизумаб: 185 из 249. Контроль: 92 из 128	[25]
Rosas I. O. et al, 2021 COVACTA	Рандомизированное, двойное слепое, многоцентровое, фазы III	438 пациентов: Тоцилизумаб — 295. Контроль — 143	Тяжёлое течение НКИ. Женщины — 30%; средний возраст (±SD) 60,9±14,6 года в группе тоцилизумаба и 60,6±13,7 года в группе плацебо.	Противовирусные, ГКС, сиптомагическая терапия	Тоцилизумаб: 58 из 294. Контроль: 28 из 144	Тоцилизумаб: 146 из 294. Контроль: 56 из 144	[26]
Salvarani C. et al, 2021 RCT-TCZ-COVID-19	Многоцентровое открытое рандомизированное исследование	130 пациентов: Тоцилизумаб — 63. Контроль — 67	Среднетяжёлое и тяжёлое течение НКИ. Группа тоцилизумаба: женщины 30%; возраст 64 (57,1–74,3); ИМТ 27,9 (23,3–30,8)	Противовирусные, антикоагулянты, сиптомагическая терапия	Тоцилизумаб: 2 из 60. Контроль: 1 из 63	Тоцилизумаб: 34 из 60. Контроль: 36 из 63	[27]

Продолжение табл. 3.  
Continuation of the table. 3.

Название	Дизайн	Число пациентов	Характеристика популяции пациентов	Разрешённые к применению ЛС	Летальность на 28-й день	14-дневное улучшение	Источник
Группа контроля: Женщин 34%; возраст 63,3 (57,1–72,3); ИМТ 27,4 (24,5–31,3)							
Somers E. C. et al, 2021	Одноцентровое когортное исследование	154 пациента: Тоцилизумаб — 78. Контроль — 76	Тяжёлое течение (ИВЛ); возраст 58±14,9; 34%; ИМТ 34,1±9,5	Гидрохлорохин Ремдесивир ГКС	Тоцилизумаб: 14 из 78. Контроль: 27 из 76	—	[28]
Soin A. S. et al, 2021, COVINTOC	Открытое, многоцентровое, рандомизированное, контролируемое исследование	179 пациентов: Тоцилизумаб — 91. Контроль — 88	Среднетяжёлое и тяжёлое течение НКИ. Группа тоцилизумаба: возраст 56 (47–63); женщин 16%; ИМТ 27,0 (4,4). Группа контроля: возраст 54 (43–63); женщин 14%; ИМТ 26,8 (4,6)	ГКС, поддерживающая терапия	Тоцилизумаб: 13 из 91. Контроль: 15 из 89	Тоцилизумаб: 64 из 91. Контроль: 66 из 88	[29]
Gordon A. C. et al, 2021	Рандомизированное, адаптивное многоцентровое исследование	895 пациентов: Тоцилизумаб — 366. Сарилумаб — 48. Контроль — 412. Другие терапевтические домены — 69	Тяжёлое течение НКИ. Возраст 61,4±12,7; женщины 27%; ИМТ 30,5 (26,8–34,9)	ГКС, терапия согласно другим доменам	Тоцилизумаб: 98 из 353. Контроль: 142 из 402	Тоцилизумаб: 119 из 353. Контроль: 105 из 402	[30]
Моисеев С. В. и др., 2021	Ретроспективное когортное исследование	328 пациентов: Тоцилизумаб — 159. Контроль — 169	Тяжёлое течение: 57% мужчины; медиана возраста 59 лет	Терапия согласно временным клиническим рекомендациям	Тоцилизумаб: 74 из 159. Контроль: 85 из 169	—	[31]
<b>Сарилумаб</b>							
Lescure F. X. et al, 2021	Адаптивное, рандомизированное, многоцентровое, двойное слепое, фазы III	416 пациентов: Сарилумаб 400 мг — 173. Сарилумаб 200 мг — 159. Контроль — 84	Тяжёлое течение НКИ. Возраст 59,0 (50,0–68,0); женщины 37%; ИМТ более 30 кг/м <sup>2</sup> 42%	Противовирусные (в том числе гидроксихорохин, азитромицин), ГКС, симптоматическая терапия	Контроль: 58 из 84. Сарилумаб 200 мг: 111 из 159. Сарилумаб 400 мг: 124 из 173.	Нет данных	[32]
NCT04315298, 2021	Многоцентровое, плацебо-контролируемое, рандомизированное, двойное слепое исследование фазы II/III	Фаза II Сарилумаб 200 мг — 187. Сарилумаб 400 мг — 180. Контроль — 90. Фаза III Сарилумаб 200 мг — 242	Тяжёлое течение НКИ	ГКС, противовирусные, симптоматическая терапия	Контроль: 24 из 90. Сарилумаб 200 мг: 60 из 187. Сарилумаб 400 мг: 49 из 180	Нет данных	[33]

Продолжение табл. 3.  
Continuation of the table. 3.

Название	Дизайн	Число пациентов	Характеристика популяции пациентов	Разрешённые к применению ЛС	Летальность на 28-й день	14-дневное улучшение	Источник
		Сарилумаб 400 мг — 338. Контроль — 170					
Gordon A. C. et al, 2021	Рандомизированное, адаптивное, многоцентровое исследование	895 пациентов: Тоцилизумаб — 366. Сарилумаб 400 мг — 48. Контроль — 412.	Тяжёлое течение НКИ; возраст 61,4±12,7; женщины 27%; ИМТ 30,5 (26,8–34,9)	ГКС, терапия согласно другим доменам	Сарилумаб: 10 из 48. Контроль: 142 из 402	Сарилумаб: 22 из 48. Контроль: 105 из 402	[30]
REMAP-CAP	исследование	400 мг — 48. Контроль — 412. Другие терапевтические домены — 69	Сарилумаб Возраст 61,7 (53,0–71,1); женщин 28%; ИМТ 27,7 (25,1–29,8)				
CORIMUNO-SARI-1	Открытое, многоцентровое, адаптивное, рандомизированное, контролируемое исследование фазы II/III	144 пациентов: Сарилумаб 400 мг — 68. Контроль — 76	Контроль Возраст 62,8 (56,0–71,7); женщин 22%; ИМТ 28,7 (24,1–31,2)	ГКС, антикоагулянты, противовирусные, антимикробные ЛС	Сарилумаб: 8 из 68. Контроль: 14 из 76	Сарилумаб: 44 из 68. Контроль: 50 из 76	[34]
Merchante N. et al, 2022	Рандомизированное, открытое, контролируемое, фазы II	Сарилумаб 200 мг — 37. Сарилумаб 400 мг — 39. Контроль — 39	Среднетяжёлое и тяжёлое течение НКИ Возраст 59 (51–70); женщин 32%; ИМТ 31 (26–33)	ГКС, гепарин, ремдесивир, симтоматическая терапия	Сарилумаб 200 мг: 4 из 37. Сарилумаб 400 мг: 0 из 39. Контроль: 3 из 39	Сарилумаб 200 мг: 28 из 37. Сарилумаб 400 мг: 30 из 39. Контроль: 30 из 39	[35]
SARICOR	фазы II	Контроль — 39					
Sancho-López A. et al, 2021	Многоцентровое, рандомизированное, открытое, фазы III	Сарилумаб 200/400 мг — 99. Контроль — 102	Сарилумаб Возраст 60,0 (52,0, 69,0); женщин 28%; ИМТ 28,86±4,49 Контроль Возраст 60,0 (54,0, 66,0); женщин 31%; ИМТ 28,85±4,82	ГКС, антикоагулянты	Сарилумаб: 2 из 99. Контроль: 2 из 102	—	[36]
SARTRE Study	фазы III	Контроль — 102					
Della-Torre E. et al, 2020	Открытое наблюдательное исследование	56 пациентов: Сарилумаб 400 мг — 28. Контроль — 28.	Мужчин 78%; Медиана возраста 56 лет	ГКС, антикоагулянты, плаквенил, антимикробные ЛС	Сарилумаб: 2 из 28. Контроль: 5 из 28	—	[37]
CORIMUNO-ANA-1, 2021	Многоцентровое открытое рандомизированное исследование	Анакинра — 59. Контроль — 55	Лёгкое и среднетяжёлое течение НКИ Анакинра: возраст 67,0; (55,5–74,3); женщин 27%;	Противовирусные, ГКС, антикоагулянты, антимикробные ЛС	Контроль: 13 из 55. Анакинра: 16 из 59	—	[38]

Продолжение табл. 3.  
Continuation of the table. 3.

Название	Дизайн	Число пациентов	Характеристика популяции пациентов	Разрешённые к применению ЛС	Летальность на 28-й день	14-дневное улучшение	Источник
			ИМТ — 27,4 (24,9; 32,0) Контроль: возраст 64,9 (59,5–78,3); женщин 33%; ИМТ 26,8 (24,7; 31,5)				
Kupiazoroulou E. et al, 2021	Двойное слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое фазы III	594 пациента: Анакинра — 405. Контроль — 189	91,6% тяжёлое течение НКИ; возраст 61,9 (12,1); женщин 42,1%; ИМТ — 29,5 (5,5)	Противовирусные, антикоагулянты, ГКС, антимикробные ЛС	Контроль: 13 из 189. Анакинра: 13 из 405	Контроль: 128 из 189. Анакинра: 314 из 405	[39]
Bozzi G. et al, 2021	Проспективное когортное исследование	120 пациента: Анакинра — 65. Контроль — 55	Тяжёлое течение НКИ Анакинра: возраст 60 (54–69); женщины 20% Контроль: возраст 63 (55–76); женщины 20%	Противовирусные, антикоагулянты, ГКС, антимикробные ЛС	Анакинра: 9 из 65. Контроль: 19 из 55	—	[40]
Kooistra E. J. et al, 2020	Проспективное когортное исследование	60 пациентов: Анакинра — 21. Контроль — 39	Тяжёлое течение НКИ (пациенты на ИВ/Л); мужчин 75%; медиана возраста 65 лет	Противовирусные, антикоагулянты, ГКС, антимикробные ЛС	Анакинра: 4 из 21. Контроль: 7 из 39	—	[41]
<b>Канакинумаб</b>							
Saitichio R. et al, 2021	Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое	Канакинумаб — 227. Контроль — 227	Средний возраст 59 лет, примерно половина страдала ожирением (ИМТ >30)	ГКС, антимикробные препараты, азитромицин, плаквенил, ремдесивир	Канакинумаб: 11 из 223. Контроль: 16 из 222	Канакинумаб: 165 из 227. Контроль: 161 из 227	[42]
<b>Нетакимаб</b>							
Avdeev S. N. et al, 2021	Ретроспективное исследование «случай-контроль»	171 пациент: Нетакимаб — 83. Контроль — 88	Медиана возраста 61 год; мужчин 51%	Терапия согласно временным клиническим рекомендациям	Контроль: 9 из 88. Нетакимаб: 7 из 83	—	[43]
<b>Прямое сравнение олокизумаба, сарилумаба и тоцилизумаба</b>							
Бобкова С. С. et al, 2021	Наблюдательное ретроспективное когортное исследование	Тоцилизумаб п/к — 114. Тоцилизумаб в/в — 86. Левелимаб — 100. Олокизумаб — 100	Мужчин 50%; средний возраст пациентов 65,5 лет	Не указана	Тоцилизумаб: 14 из 200. Олокизумаб: 5 из 100. Левелимаб: 11 из 100	—	[44]

**Примечание.** ЛС — лекарственные средства; ГКС — глюкокортикостероиды; НКИ — новая коронавирусная инфекция.  
**Note.** D — drugs; GKS — glucocorticosteroids; NCI — new coronavirus infection.

ведено смешанное сравнение эффективности альтернативных стратегий. Результаты представлены на рис. 6.

Непрямое сравнение продемонстрировало, что тоцилизумаб был эффективнее сарилумаба в отношении снижения ОР 28-дневной летальности, в то время как сравнение тоцилизумаба с левилимабом и олокизумабом продемонстрировало большую эффективность последних.

С целью оценки публикационного смещения применена методика построения воронкообразных диаграмм рассеяния (см. рис. 6).

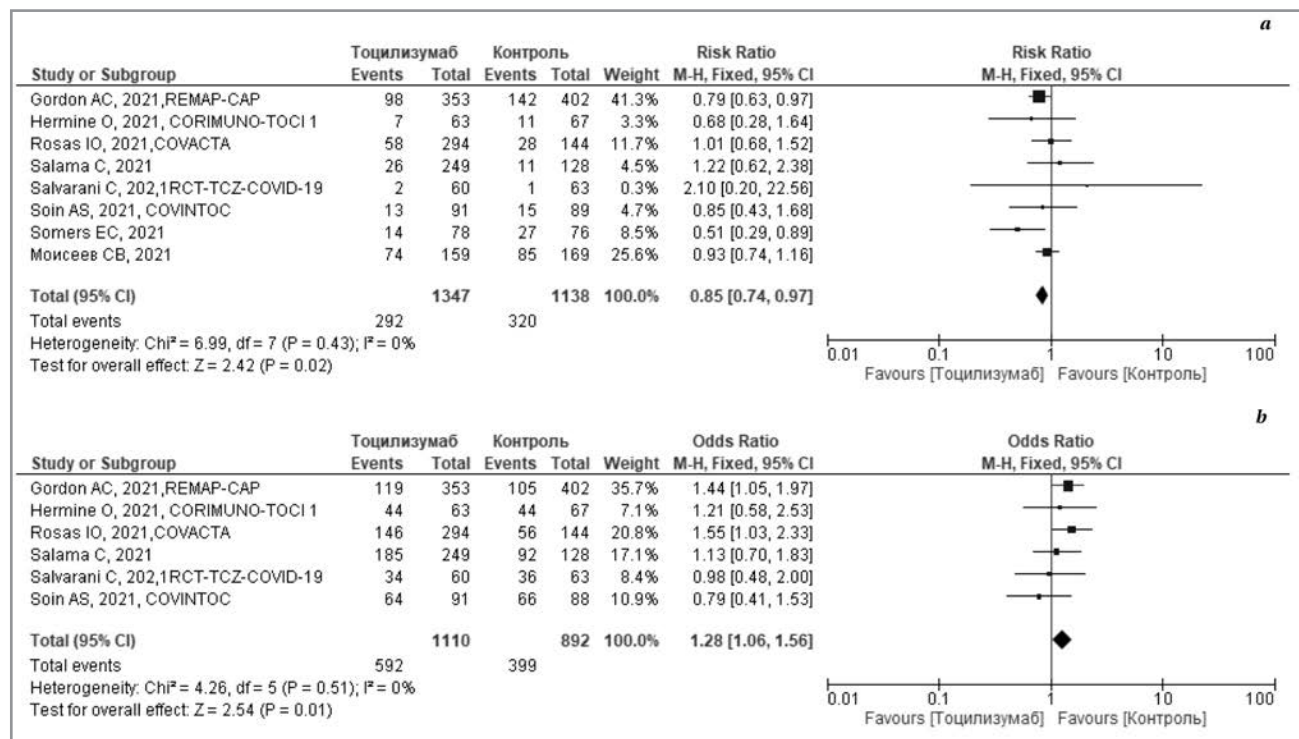
Как видно из данных, представленных на рис. 6, *a*, наблюдали асимметричность относительно оси центральной тенденции в области больших значений оси ординат, что свидетельствует о публикационном смещении результатов клинических исследований с небольшим числом пациентов. При этом результаты крупных клинических исследований были распределены относительно симметрично, что свидетельствует об отсутствии публикационного смещения их результатов. В связи с этим невозможно однозначно судить о наличии публикационного смещения среди исследований эффективности тоцилизумаба, включённых в метаанализ по исходу «ОР 28-дневной летальности». Исходя из данных, представленных на рис. 6, *b* и *c*, видно,



**Рис. 2.** Схема непрямого сравнения альтернативных стратегий

**Fig. 2.** Scheme of indirect comparison of alternative strategies.

что имеет место асимметричность относительно оси центральной тенденции вдоль всей оси ординат, что свидетельствует о публикационном

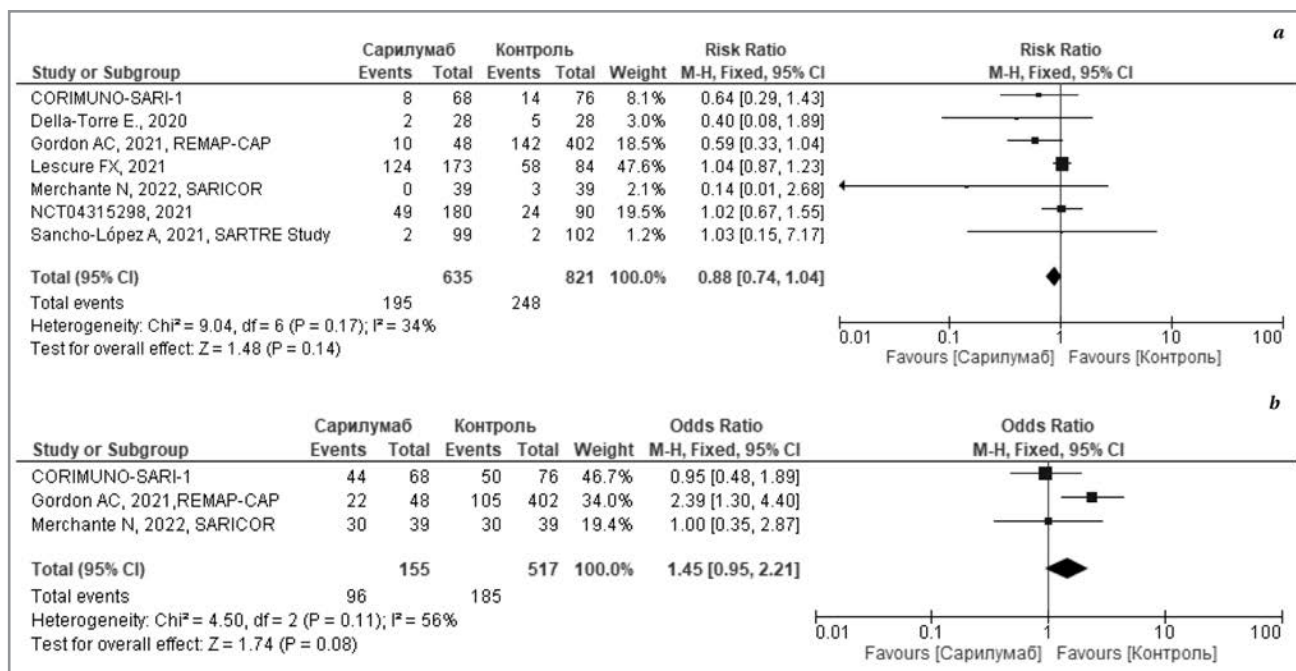


**Рис. 3.** Метаанализ исследований эффективности тоцилизумаба.

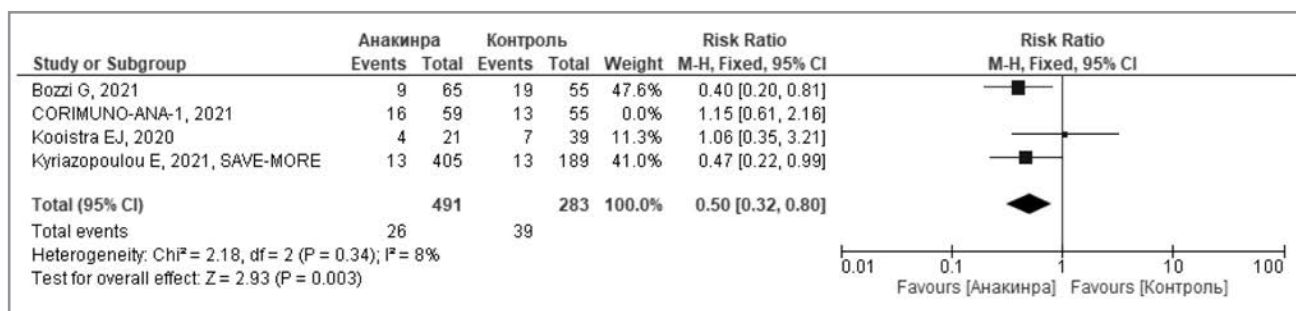
*a* — относительный риск 28-дневной летальности; *b* — отношение шансов улучшения к 14-му дню заболевания.

**Fig. 3.** Meta-analysis of studies on the efficacy of tocilizumab.

*a* — relative risk of 28-day mortality; *b* — odds ratio of improvement to the 14<sup>th</sup> day of the disease.



**Рис. 4. Метаанализ исследований эффективности сарилумаба 400 мг.**  
*a* — относительный риск 28-дневной летальности; *b* — отношение шансов улучшения к 14-му дню заболевания.  
**Fig. 4. Meta-analysis of studies on the efficacy of sarilumab 400 mg.**  
*a* — relative risk of 28-day mortality; *b* — odds ratio of improvement to the 14<sup>th</sup> day of the disease.



**Рис. 5. Метаанализ исследований эффективности анакинры.**  
 Относительный риск 28-дневной летальности.  
**Fig. 5. Meta-analysis of studies on the efficacy of anakinra.**  
 Relative risk of 28-day mortality.

смещении результатов исследований эффективности сарилумаба и анакинры в отношении исхода «ОР 28-дневной летальности».

## Обсуждение

В настоящее время в РФ только для трёх ЛС из группы анти-ИЛ (тоцилизумаба, олокизумаба, анакинра и левилимаба) в рамках процедуры ускоренной регистрации в инструкцию по медицинскому применению в качестве показания внесена патогенетическая терапия НКИ. Для сарилумаба и канакинумаба их применение при НКИ до сих пор остаётся фор-

мально off-label. Применение указанного класса ЛС по новым показаниям требует постоянной систематизации информации о её эффективности и безопасности.

В проведённый нами систематический обзор и метаанализ включены все доступные на май 2022 г. результаты рандомизированных и нерандомизированных исследований, демонстрирующие эффективность применения анти-ИЛ лекарственных средств при COVID-19. Результаты метаанализа полученных данных продемонстрировали, что только тоцилизумаб и анакинра превосходят стандартную терапию в отношении относительного риска 28-дневной летальности (ОР

**Таблица 4.** Данные по результатам сравнения эффективности применения анти-IL ЛС у пациентов с НКИ в сравнении со стандартной терапией

**Table 4.** Data on the results of comparing the effectiveness of anti- interleukin drugs in patients with NCI in comparison with standard therapy

ЛС vs контроль	ОР 28-дневной летальности [95% ДИ]	ОШ улучшения к 14-му дню заболевания [95% ДИ]
Тоцилизумаб	0,85 [0,74; 0,97], $p=0,02$	1,28 [1,06; 1,56], $p=0,01$ в пользу контроля
Сарилумаб 400 мг	0,88 [0,74; 1,04], $p=0,14$	1,45 [0,95; 2,21], $p=0,08$
Анакинра	0,5 [0,32; 0,80], $p=0,003$	—
Канакинумаб	0,68 [0,32; 1,44], $p=0,31$	0,91 [0,60; 1,37], $p=0,67$
Левелимаб	0,98 [0,25; 3,81], $p=0,97$	2,29 [1,31; 4,01], $p=0,003$
Олоклизумаб	1,50 [0,55; 4,08], $p=0,42$	1,15 [0,62; 2,12], $p=0,64$
Нетакимаб	0,82 [0,32; 2,11], $p=0,68$	—

**Примечание.** ОР — относительный риск; ОШ — отношение шансов; ДИ — доверительный интервал; ЛС — лекарственное средство.

**Note.** OR — relative risk; OR — odds ratio; CI — confidence interval; D — drug.

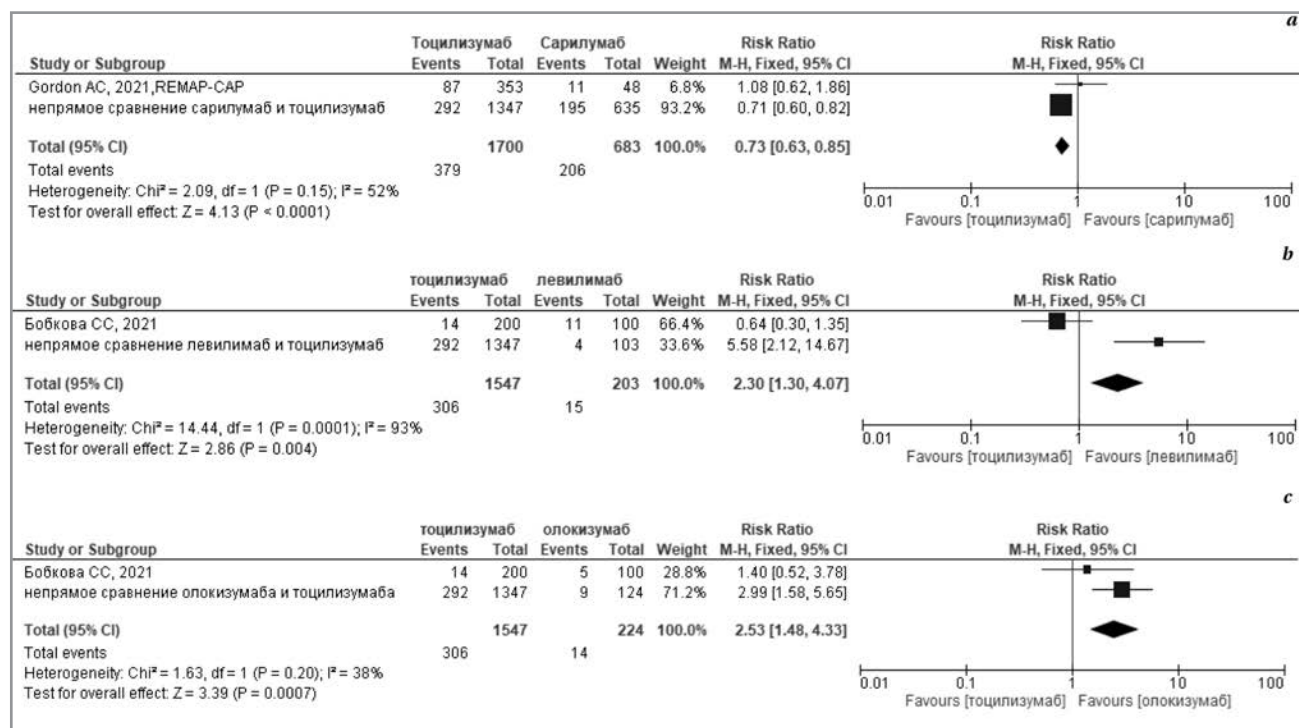
**Таблица 5.** Результаты непрямого сравнения эффективности ЛС тоцилизумаб и анакинры в отношении снижения относительного риска 28-дневной летальности

**Table 5.** Results of an indirect comparison of the efficacy of tocilizumab and anakinra to reducing the relative risk of 28-day mortality

Критерий	Тоцилизумаб	Анакинра	Результаты непрямого сравнения
ОР 28-дневной летальности	0,85 [95% ДИ 0,74; 0,97], $p=0,02$	0,5 [95% ДИ 0,32; 0,80], $p=0,02$	1,2 [95% ДИ 1,16; 1,25], $p=0,0001$

**Примечание.** ОР — относительный риск; ДИ — доверительный интервал.

**Note.** OR — relative risk; CI — confidence interval.



**Рис. 6.** Результаты смешанного сравнения (a) тоцилизумаба и сарилумаба; (b) тоцилизумаба и левелимаба; (c) тоцилизумаба и олоклизумаба.

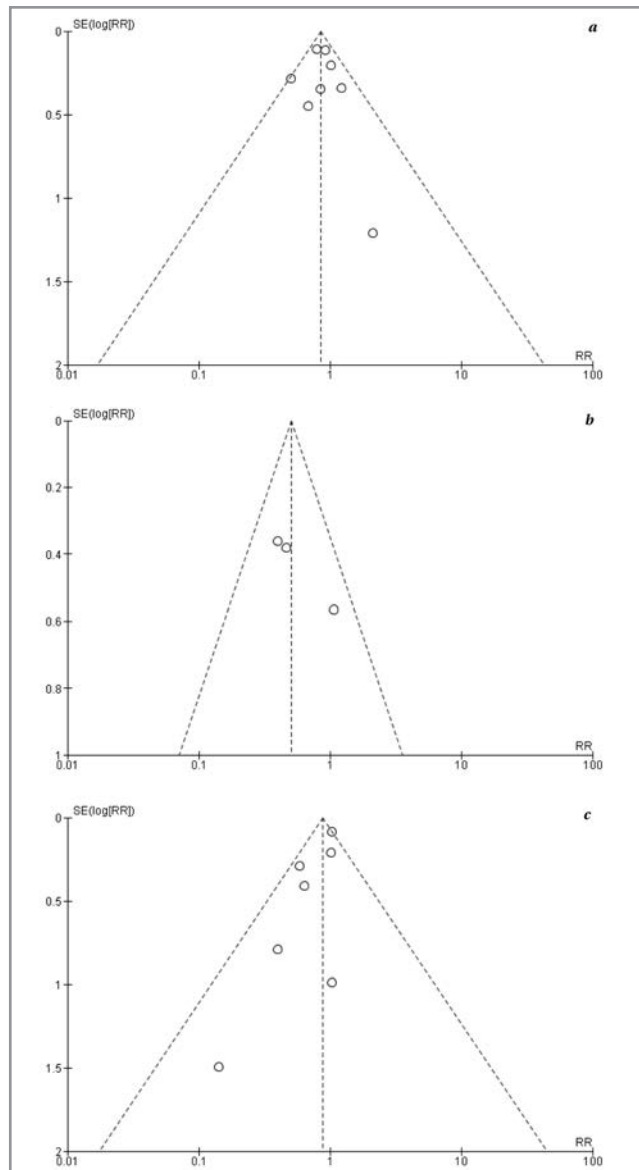
**Fig. 6.** Results of a mixed comparison (a) of tocilizumab and sarilumab; (b) tocilizumab and levilimab; (c) tocilizumab and olokizumab

0,85 [95% ДИ 0,74; 0,97] и 0,5 [95% ДИ 0,32; 0,80], соответственно). Для левилимаба в сравнении со стандартной терапией продемонстрирована большая эффективность в отношении показателя «ОШ улучшения к 14-му дню заболевания», которое составило 2,29 [1,31; 4,01].

При непрямом сравнении тоцилизумаба и анакинры в отношении снижения ОР 28-дневной летальности последний показал большую эффективность: ОР составил 1,2 [95% ДИ 1,16; 1,25].

Крайне важно подчеркнуть высокие риски публикационного смещения: преимущественного опубликования положительных результатов исследований (т. е. соответствующих цели авторов) и не опубликование отрицательных и неопределённых результатов, что может не позволить достоверно оценить эффекты и безопасность изучаемого вмешательства [45]. Для сарилумаба и анакинры такие риски крайне велики. Более того, необходимо отметить, что исследования, в которых оценивали эффективность левилимаба и олокизумаба в сравнении с контролем, также как и исследование прямого сравнения олокизумаба, тоцилизумаба и левилимаба, обладали несравнимо меньшей мощностью в сравнении с исследованиями тоцилизумаба: суммарно левилимаб в рамках исследований получили 203 пациента, олокизумаб — 224 пациента, в то время как эффективность тоцилизумаба оценена суммарно у 1700 пациентов [22, 23, 44].

Безусловно требуется дальнейшее изучение как эффективности, так и безопасности анти-ИЛ, в том числе в рамках исследований реальной клинической практики, которое позволит найти «золотую середину» между пользой и рисками их применения у пациентов с новой коронавирусной инфекцией.



**Рис. 7.** Воронкообразные диаграмма рассеяния по исходу «ОР 28-дневной летальности».

*a* — тоцилизумаб; *b* — анакинра; *c* — сарилумаб.

**Fig. 7.** Funnel-shaped scattering diagrams of the outcome of the «OR 28-day mortality»: (*a*) tocilizumab; (*b*) anakinra; (*c*) sarilumab

## Литература/References

1. (Временные методические рекомендации. Профилактика диагностики и лечение новой коронавирусной инфекции (версия 15.0 от 22.02.2022. Доступно по ссылке: [https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0\\_COVID-19\\_V16.pdf](https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V16.pdf). [Temporary methodological recommendations. Prevention, diagnosis and treatment of a new coronavirus infection (version 16.0 of 18/08/2022). Available at: [https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0\\_COVID-19\\_V16.pdf](https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V16.pdf). Accessed 01Sep2022. (in Russian)])
2. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395: 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
3. Del Valle D.M., Kim-Schulze S., Huang H.H., Beckmann N.D., Nirenberg S., Wang B. et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19

severity and survival. *Nat Med*. 2020; 26:1636–1643. doi: 10.1038/s41591-020-1051-9.

4. Dorward D.A., Russell C.D., Um I.H., Elshani M., Armstrong S.D., Penrice-Randal R. et al. Tissue-specific immunopathology in fatal COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021; 203: 192–201. doi: 10.1164/rccm.202008-3265OC.
5. RECOVERY Collaborative Group, Horby P., Lim W.S., Emberson J.R., Mafham M., Bell J.L., Linsell L. et al. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384: 693–704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436.
6. WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group, Sterne J.A.C., Murthy S., Diaz J.V., Slutsky A.S., Villar J., Angus D.C. et al. Association between administration of systemic corticosteroids and mortality among critically ill patients with COVID-19: a meta-analysis. *JAMA*. 2020; 324: 1330–1341. doi: 10.1001/jama.2020.17023.
7. World Health Organization. Therapeutics and COVID-19. Living guideline. Last updated 03 Mar 2022. Available at: <https://www.bmj.com/content/370/bmj.m3379>. Accessed 05Apr2022.



8. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Accessed 05Jun2022.
9. Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по ссылке: [www.grls.roszdravnadzor.ru](http://www.grls.roszdravnadzor.ru). Ссылка активна на 05 июня 2022 г. [State Register of Medicines. Available at: [www.grls.roszdravnadzor.ru](http://www.grls.roszdravnadzor.ru). Accessed 05Jun 2022. (in Russian)]
10. Реброва О.Ю., Федяева В.К., Хачатрян Г.Р. Адаптация и валидизация вопросника для оценки риска систематических ошибок в рандомизированных контролируемых испытаниях. Медицинские технологии. Оценка и выбор. 2015; 1: 9–17. [Rebrova O.Yu., Fedyayeva V.K., Khachatryan G.R. Adaptation and validation of the questionnaire to assess the risk of systematic errors in randomized controlled trials. Medical technologies. Assessment and Choice. 2015; 1: 9–17. (in Russian)]
11. Реброва О.Ю., Федяева В.К. Вопросник для оценки риска систематических ошибок в нерандомизированных сравнительных исследованиях: русскоязычная версия шкалы Ньюкасл-Оттава. Медицинские технологии. Оценка и выбор. 2016; 3: 14–19. [Rebrova O.Yu., Fedyayeva V.K. Questionnaire for assessing the risk of systematic errors in non-randomized comparative studies: the Russian version of the Newcastle-Ottawa scale. Medical technologies. Assessment and Choice. 2016; 3: 14–19. (in Russian)]
12. Maslennikov R., Ivashkin V., Vasilieva E., Chipurik M., Semikova P., Semenets V. et al. Interleukin 17 antagonist netakimab is effective and safe in the new coronavirus infection (COVID-19). Eur Cytokine Netw. 2021; 32 (1): 8–14. doi: 10.1684/ecn.2021.0463.
13. Антонов В.Н., Игнатова Г.Л., Прибыткова О.В., Слепцова С.С., Стребкова Е.А., Худякова Е.А. и др. Опыт применения олокизумаба у больных COVID-19. Терапевтический архив. 2020; 92 (12): 148–154. doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.12.200522>. [Antonov V.N., Ignatova G.L., Pribytkova O.V., Slepitsova S.S., Strebkova E.A., Khudyakova E.A. et al. Experience of olokizumab use in COVID-19 patients. Ter Arkh. 2020; 92 (12): 148–154. doi: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.12.200522>. (in Russian)]
14. Tocilizumab for patients with cancer and COVID-19 disease. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04370834>. Accessed 05Jun2022
15. Kumar P.N., Hernández-Sánchez J., Nagel S., Feng Y., Cai F., Rabin J. et al. Safety and efficacy of Tocilizumab 4 or 8 mg/kg in hospitalized patients with moderate to severe coronavirus disease 2019 pneumonia: a randomized clinical trial. Open Forum Infect Dis. 2021; 9 (1): ofab608. doi: 10.1093/ofid/ofab608.
16. Zhao H., Zhu Q., Zhang C., Li J., Wei M., Qin Y. et al. Tocilizumab combined with favipiravir in the treatment of COVID-19: A multicenter trial in a small sample size. Biomed Pharmacother. 2021; 133: 110825. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110825.
17. Wang D., Fu B., Peng Z., Yang D., Han M., Li M. et al. Tocilizumab in patients with moderate or severe COVID-19: a randomized, controlled, open-label, multicenter trial. Front Med. 2021; 15 (3): 486–494. doi: 10.1007/s11684-020-0824-3.
18. Rodríguez-Baño J., Pachón J., Carratalà J., Ryan P., Jarrín I., Yllescas M. et al. Treatment with tocilizumab or corticosteroids for COVID-19 patients with hyperinflammatory state: a multicentre cohort study (SAM-COVID-19). Clin Microbiol Infect. 2021; 27 (2): 244–252. doi: 10.1016/j.cmi.2020.08.010.
19. Huet T., Beauissier H., Voisin O., Jouveshomme S., Dauriat G., Lazareth I. et al. Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. Lancet Rheumatol. 2020; 2 (7): e393–e400. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30164-8.
20. Pontali E., Volpi S., Signori A., Antonucci G., Castellaneta M., Buzzi D. et al. Efficacy of early anti-inflammatory treatment with high doses of intravenous anakinra with or without glucocorticoids in patients with severe COVID-19 pneumonia. J Allergy Clin Immunol. 2021; 147 (4): 1217–1225. doi: 10.1016/j.jaci.2021.01.024.
21. Mehta M., Purpura L.J., McConville T.H., Neidell M.J., Anderson M.R., Bernstein E.J. et al. What about tocilizumab? A retrospective study from a NYC Hospital during the COVID-19 outbreak. PLoS One. 2021; 16 (4): e0249349. doi: 10.1371/journal.pone.0249349.
22. Lomakin N.V., Bakirov B.A., Protsenko D.N., Mazurov V.I., Musaev G.H., Moiseeva O.M. et al. The efficacy and safety of levilimab in severely ill COVID-19 patients not requiring mechanical ventilation: results of a multicenter randomized double-blind placebo-controlled phase III CORONA clinical study. Inflamm Res. 2021; 70 (10–12): 1233–1246. doi: 10.1007/s00011-021-01507-5.
23. Study of the Efficacy and Safety of a Single Administration of Olokizumab and RPH-104 with standard therapy in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection (COVID-19). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04380519>. Accessed 05Jun2022.
24. Hermine O., Mariette X., Tharaux P.L., Resche-Rigon M., Porcher R., Ravaud P. et al. Effect of Tocilizumab vs usual care in adults hospitalized with COVID-19 and Moderate or severe pneumonia: a randomized clinical trial. JAMA Intern Med. 2021; 181 (1): 32–40. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.6820.
25. Salama C., Han J., Yau L., Reiss W.G., Kramer B., Neidhart J.D. et al. Tocilizumab in patients hospitalized with Covid-19 pneumonia. N Engl J Med. 2021; 384 (1): 20–30. doi: 10.1056/NEJMoa2030340.
26. Rosas I.O., Bräu N., Waters M., Go R.C., Hunter B.D., Bhagani S. et al. Tocilizumab in hospitalized patients with severe COVID-19 pneumonia. N Engl J Med. 2021; 384 (16): 1503–1516. doi: 10.1056/NEJMoa2028700.
27. Salvarani C., Dolci G., Massari M., Merlo D.F., Cavuto S., Savoldi L. et al. Effect of Tocilizumab vs standard care on clinical worsening in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia: a randomized clinical trial. JAMA Intern Med. 2021; 181 (1): 24–31. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.6615.
28. Somers E.C., Eschenauer G.A., Troost J.P., Golob J.L., Gandhi T.N., Wang L. et al. Tocilizumab for treatment of mechanically ventilated patients with COVID-19. Clin Infect Dis. 2021; 73 (2): e445–e454. doi: 10.1093/cid/ciaa954.
29. Soin A.S., Kumar K., Choudhary N.S., Sharma P., Mehta Y., Kataria S. et al. Tocilizumab plus standard care versus standard care in patients in India with moderate to severe COVID-19-associated cytokine release syndrome (COVINTOC): an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 trial. Lancet Respir Med. 2021; 9 (5): 511–521. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00081-3.
30. Gordon A.C., Mouncey P.R., Al-Beidh F., Rowan K.M., Nichol A.D., Arabi Y.M. et al. Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill Patients with COVID-19. N Engl J Med. 2021; 384 (16): 1491–1502. doi: 10.1056/NEJMoa2100433.
31. Моисеев С.В., Авдеев С.Н., Тао Е.А., Бровко М.Ю., Яворовский А.Г., Умбетова К.Т. и др. Эффективность тоцилизумаба у пациентов с COVID-19, госпитализированных в ОРИТ: ретроспективное когортное исследование. Клиническая фармакология и терапия. 2020; 29 (4): 17–25. doi: 10.32756/0869-5490-2020-4-17-25. [Moiseev S.V., Avdeev S.N., Tao E.A., Brovko M.Yu., Yavorovskiy A.G., Umbetova K.T. et al. Efficacy of tocilizumab in patients with COVID-19 hospitalized in the ICU: a retrospective cohort study. Klin Pharmacol Ter. 2020; 29 (4): 17–25. DOI 10.32756/0869-5490-2020-4-17-25. (in Russian)]
32. Lescure F.X., Honda H., Fowler R.A., Lazar J.S., Shi G., Wung P. et al. Sarilumab in patients admitted to hospital with severe or critical COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Respir Med. 2021; 9 (5): 522–532. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00099-0.
33. Sivapalasingam S., Lederer D.J., Bhore R., Hajizadeh N., Criner G., Hosain R., Mahmood A., Giannelou A. et al. Sarilumab-COVID-19 Study Team. Efficacy and safety of Sarilumab in hospitalized patients with COVID-19: a randomized clinical trial. Clin Infect Dis. 2022 Feb 26: ciac153. doi: 10.1093/cid/ciac153.
34. CORIMUNO-19 Collaborative group. Sarilumab in adults hospitalised with moderate-to-severe COVID-19 pneumonia (CORIMUNO-SARI-1): An open-label randomised controlled trial. Lancet Rheumatol. 2022; 4(1): e24–e32. doi: 10.1016/S2665-9913(21)00315-5.
35. Merchant N., Cárcel S., Garrido-Gracia J.C., Trigo-Rodríguez M., Moreno M.Á.E., León-López R. et al. Early use of Sarilumab in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia and features of systemic inflammation: the SARICOR randomized clinical trial. Antimicrob Agents Chemother. 2022; 66 (2): e0210721. doi: 10.1128/AAC.02107-21.
36. Sancho-López A., Caballero-Bermejo A.F., Ruiz-Antorán B., Muñoz Rubio E., García Gasalla M., Buades J. et al. Efficacy and safety of Sarilumab in patients with COVID-19 pneumonia: a randomized, phase III Clinical trial (SARTRE Study). Infect Dis Ther. 2021; 10 (4): 2735–2748. doi: 10.1007/s40121-021-00543-2.
37. Della-Torre E., Campochiaro C., Cavalli G., De Luca G., Napolitano A., La Marca S. et al. Interleukin-6 blockade with sarilumab in severe COVID-19 pneumonia with systemic hyperinflammation: an open-label cohort study. Ann Rheum Dis. 2020; 79 (10): 1277–1285. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-218122.
38. CORIMUNO-19 Collaborative group. Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial. Lancet Respir Med. 2021; 9 (3): 295–304. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30556-7.
39. Kyriazopoulou E., Poulakou G., Milionis H., Metallidis S., Adamis G., Tsiakos K. et al. Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: a double-blind, randomized controlled phase 3 trial. Nat Med. 2021; 27 (10): 1752–1760. doi: 10.1038/s41591-021-01499-z.
40. Bozzi G., Mangioni D., Minoia E., Aliberti S., Grasselli G., Barbeta L. et al. Anakinra combined with methylprednisolone in patients with severe COVID-19 pneumonia and hyperinflammation: An observational cohort

- study. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Feb; 147 (2): 561–566.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2020.11.006.
41. Kooistra E.J., Waalders N.J.B., Grondman I., Janssen N.A.F., de Nooijer A.H., Netea M.G. et al. Anakinra treatment in critically ill COVID-19 patients: a prospective cohort study. *Crit Care.* 2020; 24 (1): 688. doi: 10.1186/s13054-020-03364-w.
  42. Caricchio R., Abbate A., Gordeev I., Meng J., Hsue P.Y., Neogi T. et al; CAN-COVID Investigators. Effect of Canakinumab vs Placebo on survival without invasive mechanical ventilation in patients hospitalized with severe COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2021; 326 (3): 230–239. doi: 10.1001/jama.2021.9508.
  43. Avdeev S.N., Trushenko N.V., Tsareva N.A., Yaroshetskiy A.I., Merzhoeva Z.M., Nuralieva G.S. et al. Anti-IL-17 monoclonal antibodies in hospitalized patients with severe COVID-19: A pilot study. *Цитокин.* 2021 Oct; 146: 155627. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155627.
  44. Бобкова С.С., Жуков А.А., Проценко Д.Н., Самойленко В.В., Тюрин И.Н. Сравнительная эффективность и безопасность применения препаратов моноклональных антител к ИЛ-6 у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 тяжелого течения. Ретроспективное когортное исследование. Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова. 2021; 1: 69–76. doi: 10.21320/1818-474X-2021-1-69-76. [Bobkova S.S., Zhukov A.A., Protsenko D.N., Samoylenko V., Tyurin I.N. Comparative efficacy and safety of the use of IL-6 monoclonal antibodies in patients with severe new COVID-19 coronavirus infection. A retrospective cohort study. *Bulletin of Intensive Care* named after A.I. Saltanov. 2021; 1: 69–76. doi: 10.21320/18-474 X-2021-1-69-76. (in Russian)]
  45. Реброва О.Ю., Домбровский В.С. К вопросу о регистрации и опубликовании результатов клинических испытаний, проводимых в Российской Федерации. Медицинские технологии. Оценка и выбор. 2014; 2 (16): 8–10. [Rebrova O.Y., Dombrovsky V.C. On the issue of registration and publication of the results of clinical trials conducted in the Russian Federation. *Medical Technologies. Assessment and Choice.* 2014; 2 (16): 8–10. (in Russian)]

## Информация об авторах

*Гомон Юлия Михайловна* — д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии и доказательной медицины, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России; врач-клинический фармаколог, СПб ГБУЗ «Больница Святого Великомученика Георгия», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0001-7704-9900

*Колбин Алексей Сергеевич* — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и доказательной медицины, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России; профессор кафедры фармакологии, медицинский факультет, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0002-1919-2909

*Фахрутдинова Айгуль Минсалиховна* — врач-терапевт, пульмонолог, отделение терапии, СПб ГБУЗ «Больница Святого Великомученика Георгия», Санкт-Петербург, Россия

*Усманова Татьяна Андреевна* — научный сотрудник, кафедра клинической фармакологии и доказательной медицины, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*Султанова Флора Миргалимовна* — координатор учебного центра РОЭХ, СПб ГБУЗ Больница Св. Георгия (Санкт-Петербург, Россия), Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-1626-6025

*Балыкина Юлия Ефимовна* — к. ф.-м. н., кафедра процессов управления, факультет прикладной математики, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия. ORCID: 0000-0003-2143-0440

## About the authors

*Yuliya M. Gomon* — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Evidence-based Medicine, First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlova Ministry of Health of Russia; doctor-clinical pharmacologist, Hospital of St. George the Great Martyr, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0001-7704-9900

*Alexey A. Kolbin* — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, ФГБОУ First St. Petersburg State Medical University named after Academician I. P. Pavlova Ministry of Health of Russia; Professor of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0002-1919-2909

*Aigul M. Fahrutdinova* — General practitioner, pulmonologist, Department of therapy, Department of Pharmacology, Hospital of St. George the Great Martyr, St. Petersburg, Russia

*Tatiana A. Usmanova* — Researcher, Department of Clinical Pharmacology and Evidence-based Medicine, First St. Petersburg State Medical University named after Academician I. P. Pavlova Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russia

*Flora M. Sultanova* — Coordinator of the training center of the Russian Society of Endoscopic Surgeons, Hospital of St. George the Great Martyr, St. Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-1626-6025

*Yulia E. Balykina* — PhD. Physical and mathematics sciences, Department of Management Processes, Faculty of Applied Mathematics, Petersburg, Russia. ORCID: 0000-0003-2143-0440

## Антибиотикорезистентность. Вызов современности

А. Д. ДАУДОВА, Ю. З. ДЕМИНА, Г. Н. ГЕНАТУЛЛИНА, Р. О. АБДРАХМАНОВА,  
Г. Р. БАЕВА, \*А. Л. ЯСЕНЯВСКАЯ, О. В. РУБАЛЬСКИЙ

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

## Antibacterial Resistance. The Challenge of Modernity

ADILYA D. DAUDOVA, JULIA Z. DEMINA, GUZEL N. GENATULLINA,  
RADMILA O. ABDRAKHMANOVA, GUZEL R. BAEVA,  
\*ANNA L. YASENYAVSKAYA, OLEG V. RUBALSKY

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

### Резюме

Устойчивость к противомикробным препаратам рассматривается ВОЗ как одна из наиболее важных угроз общественному здоровью в двадцать первом веке. Согласно прогнозам, к 2025 г., многие antimicrobials потеряют свою эффективность и начнется «пост-антибиотическая эра». К микроорганизмам, которые играют преимущественную роль в развитии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи и приводящие к летальным последствиям, американским обществом инфекционных болезней отнесены *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. и представители рода *Mycobacterium*. В обзоре освещены механизмы антибиотикорезистентности и многие варианты противостояния микробов антибиотикам. Знание молекулярных механизмов формирования устойчивости микроорганизмов позволяет разработать стратегические направления её преодоления. Поиск новых путей предупреждения и преодоления формирования устойчивости возбудителей к антибиотикам является чрезвычайно важной задачей современной медицинской науки. Представлена эффективность гибридных антибиотиков, связанных с химическими соединениями, обладающих различным специфическим воздействием. Перспективным считается применение основного действующего фактора вируса бактерий — эндолизина как в чистом виде, так и в составе гомодимеров, например, лизопротеина, представляющего собой комплекс эндолизина с иммуноглобулинами человека. Фаготерапия будущего — это персонализированная фаготерапия, требующая создания библиотеки или банка фагов.

**Ключевые слова:** бактериофаг; инфекции, связанные со здравоохранением; биоплёнки; фаготерапия

**Для цитирования:** : Даудова А. Д., Демина Ю. З., Генатуллина Г. Н., Абдрахманова Р. О., Баева Г. Р., Ясенявская А. Л., Рубальский О. В. Антибиотикорезистентность. Вызов современности. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 66–75. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-66-75>.

### Abstract

Antimicrobial resistance is considered by WHO as one of the most important threats to public health in the twenty-first century. According to forecasts, by 2025, many first-line antimicrobials will lose their effectiveness and the «post-antibiotic era» will begin. *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. and representatives of the genus *Mycobacterium* are classified by the American Society of Infectious Diseases as microorganisms that play a predominant role in the development of infections associated with medical care and leading to fatal consequences. The review highlights the mechanisms of antibiotic resistance and many variants of microbial resistance to antibiotics. Knowledge of the molecular mechanisms of the formation of resistance of microorganisms allows us to develop strategic directions for overcoming it. The search for new ways to prevent and overcome the formation of resistance of pathogens to antibiotics is an extremely important task of modern medical science. The effectiveness of hybrid antibiotics associated with chemical compounds with various specific effects is presented. The use of the main active factor of the bacterial virus, endolysin, both in its pure form and as part of homodimers, for example, lysoprotein, which is a complex of endolysin with human immunoglobulins, is considered promising. Phage therapy of the future is a personalized phage therapy that requires the creation of a library or bank of phages.

**Keywords:** bacteriophage; healthcare-associated infections; biofilms; phage therapy

**For citation:** Daudova A. D., Demina J. Z., Genatullina G. N., Abdрахmanova R. O., Baeva G. R., Yasyenyavskaya A. L., Rubalsky O. V. Antibacterial resistance. The challenge of modernity. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 66–75. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-66-75>.

Эра антибиотикотерапии, начавшая свой отсчёт с момента открытия Флемингом пеницилина, является одним из наиболее значимых, революционных этапов развития медицины и науки в целом [1]. «Золотой век» химиотерапии (1950–1970 г.) ознаменован появлением большинства классов антибактериальных препаратов, используемых и по настоящее время [2].

Однако эволюция микробов, их стремление к сохранению жизнеспособности в новых условиях существования обусловило появление феномена устойчивости к лекарственным средствам [3]. Всего через несколько лет от начала применения противомикробных препаратов появились тревожные сигналы о развитии резистентности. Ещё в 1954 г. Флеминг, основываясь на своих ранних наблюдениях, предсказал, что необдуманное использование антибактериальных лекарственных средств может привести к отбору и размножению избранных антибиотикорезистентных мутантов бактерий [4].

Неразумное и широкое применение антимикробных является триггером повышения устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, что в итоге становится глобальной проблемой современности. Особую тревогу вызывает то, что после одобрения линезолида в 2000 г., не появилось новых химических формул и классов антибактериальных препаратов [5]. У больных с инфекциями, вызванными устойчивыми к лечению микроорганизмами, наблюдаются более тяжёлые симптомы, в большинстве случаев они должны быть госпитализированы, и лечение требует применения резервных препаратов. Это увеличивает затраты на лечение, ухудшает прогноз и создаёт условия для появления персистирующих форм микроорганизмов и как следствие приводит к возникновению эпидемий.

Устойчивость к противомикробным препаратам рассматривается ВОЗ как одна из наиболее важных угроз общественному здоровью в двадцать первом веке [6, 7].

Согласно прогнозам, быстрое развитие устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам может в краткосрочной перспективе привести к риску осложнений от вторичных инфекций при любом инструментальном вмешательстве [8].

Прогнозируемая смертность от инфекций, вызванных устойчивыми к лекарственным препаратам штаммами бактерий, может увеличиться к 2050 г. до двадцати миллионов случаев при экономических потерях более чем 2,9 трлн долларов [9].

Микроорганизмы, которые играют преимущественную роль в развитии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) и приводящих к летальным последствиям, американским обществом инфекционных болезней

(IDSA) определены как патогены (ESKAPE). К данной группе микроорганизмов, состоящей из *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. были добавлены представители рода *Mycobacterium* [10].

Этих бактерий характеризует высокая устойчивость ко многим бета-лактамам антибиотикам, включая карбапенемы и цефалоспорины третьего поколения, которые максимально востребованы при лечении инфекций, вызванных полирезистентными штаммами бактерий.

Устойчивость к противомикробным лекарственным препаратам в зависимости от механизмов её формирования можно разделить на две группы: естественную (природную, видовую) и приобретённую.

Видовая (естественная) резистентность — это постоянный, генетически обусловленный признак, фенотип которого проявляется в отсутствии мишени действия антибиотика [11].

Понятие приобретённой устойчивости применяется в отношении изначально чувствительных бактерий, у которых в процессе адаптации появляются механизмы, позволяющие им уклоняться от действия антибактериальных препаратов [12].

Спектр механизмов антибиотикорезистентности вариативен: ферментативная модификация или деградация противомикробного средства, снижение поглощения антибиотиков из-за изменения проницаемости внешней мембраны, выведение лекарственных препаратов с помощью эффлюксных насосов микробной клетки, формирование метаболического «шунта», модификация противомикробной мишени, избыточная продукция фермента-мишени [13, 14].

**Ферментативная модификация или деградация противомикробного средства.** Наиболее показательным примером являются бета-лактамазы, гидролизующие бета-лактамы антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины). Бета-лактамазы кодируются хромосомными или плазмидными генами. Некоторые из ферментов проявляют специфическую активность в отношении определённых субстратов, другие же обладают расширенным инактивирующим спектром (бета-лактамазы расширенного спектра — БЛРС). Механизм действия второго типа ферментов заключается в модификации антибиотика, что в итоге нарушает его взаимодействие с целевой клеткой. Так, N-ацетилтрансфераза обеспечивает присоединение дополнительной ацетильной группы ( $\text{CH}_3\text{CO}-$ ) к аминогликозидам, в частности, к канамицину, и, как следствие, блокирует его взаимодействие с рибосомой [15].

**Снижение поглощения из-за изменения проницаемости внешней мембраны.** Проницаемость клеточных мембран может быть изменена мута-

циями в порах, связанных с дефицитом порина, изменением размера или проводимости пориновых каналов и низкой экспрессией гена, кодирующего порин [16].

Наружная мембрана клеточной стенки грамотрицательных бактерий служит дополнительной преградой на пути антибиотиков и способствует снижению их проникновения внутрь клетки.

**Выведение лекарственных препаратов с помощью эффлюксных насосов микробной клетки.** Эффлюксные насосы представлены белками-переносчиками, локализованными в цитоплазматической мембране клетки. Первичные активные переносчики используют в качестве источника энергии аденозинтрифосфат. Во вторичных активных транспортерах перенос опосредован электрохимической разностью потенциалов, вызванной удалением внеклеточных ионов водорода и натрия [17]. Такие механизмы бактериальной резистентности были выявлены к тетрациклину, макролиду, хинолону и амфениколу. Например, гены *tet* кодируют эффлюксные насосы, специфичные для тетрациклинов, а ген *mef* кодирует эффлюксный насос, специфичный для макролидов [18].

**Формирование метаболического «шунта».** Данный механизм связан с приобретением новых генов, кодирующих продукт, альтернативный ингибируемому антибиотиком. По подобному механизму, белок MfrA в плазмиде pGADIV представителей рода *Mycobacterium* имитирует структуру ДНК и взаимодействует с ферментами-мишенями хинолонов — ДНК-гиразой и топоизомеразой IV, ингибируя их антибактериальную активность, увеличивая минимальную подавляющую концентрацию (МПК) фторхинолонов в 2–8 раз [19, 20].

**Модификация противомикробной мишени.** Данный механизм связан с формированием «ложных цепей», опосредованных метаболитами, синтезируемыми микроорганизмами. Продуцируемые белки нарушают взаимодействие антибактериального препарата с целевыми точками воздействия (ферментами, рибосомами, нуклеотидными последовательностями) [21–23].

Мишенью многих антибактериальных препаратов являются бактериальные рибосомы [24]. Модификация молекул нуклеиновых кислот бактериальной 16S рРНК метилазой выступает в качестве одного из механизмов устойчивости к аминогликозидам. Она способна вносить изменения в структуру бактериальной рибосомы, что блокирует связь с аминогликозидами способствуя синтезу белков и беспрепятственному потоку генетической информации в клетке [25].

Ген *erm* (семейство генов эритромицин-рибосомной метилазы) является фактором, определяющим устойчивость не только к макролидам, но и к линкозамидам и стрептограмину. Фенотип MLSB (макролид-линкозамид-стрептограмин В)

представляет собой пример перекрестной резистентности [25].

Основным механизмом устойчивости к хинолонам является изменение структуры топоизомераз в результате мутаций в соответствующих генах. Мутации в генах *gyr* и *par*, кодирующих ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, соответственно, изменяют мишень действия хинолоновых антимикробных препаратов и являются основой формирования резистентности к антибиотикам этой группы [26, 27].

Гены *tet* (M, O, Q, S, T) несут информацию о белках, которые взаимодействуя с рибосомами, препятствуют их связыванию с антибиотиками группы тетрациклина. Известно, что ген *cfr*, кодирующий РНК-метилтрансферазу, участвует в формировании множественной лекарственной устойчивости к оксазолидинонам. Последние рассматриваются в настоящее время как препараты выбора в лечении стафилококковых инфекций и инфекций, вызванных резистентными энтерококками [15].

**Избыточная продукция фермента-мишени.** Механизм устойчивости к триметоприму у *Escherichia coli* и *Haemophilus influenzae* обусловлен избыточным синтезом мишени бактериальной клетки, что приводит к превалированию её концентрации над концентрацией антибактериального препарата и, как следствие, снижению его активности [28].

Эволюция феномена антибиотикоустойчивости бактерий продолжается. Особую настороженность вызывает тот факт, что многочисленные варианты механизмов способствуют формированию поли- и панрезистентных штаммов микробов за короткий срок [29–31].

Множественная лекарственная устойчивость у филогенетически отдалённых видов бактерий формируется с участием разнообразных механизмов горизонтального переноса: трансформации, трансдукции и конъюгации.

Бактериальная трансформация представляет собой генетическое изменение в клетке в результате прямого поглощения, включения и экспрессии экзогенной ДНК между близкородственными бактериями [32]. Чтобы трансформация произошла, ДНК должна быть перенесена с поверхности на цитоплазматическую мембрану, а затем пересечь цитоплазматическую мембрану через высококонсервативный мембранный канал [33].

Другим механизмом горизонтального переноса генов является трансдукция, при которой перенос ДНК опосредуется бактериальными вирусами, которые «инъецируют» ДНК донора в клетку-реципиент. Введённый генетический материал, интегрируясь в хромосомную ДНК, запускает литический либо лизогенный цикл [34].

Конъюгация считается основным признанным механизмом, ответственным за перенос ге-

нетического материала у бактерий и за появление множественной лекарственной устойчивости [35, 36]. Этот процесс использует систему секреции IV типа, которая способствует образованию фимбри на поверхности бактерий, создающих межклеточный контакт и участвующих в передаче генетического материала между бактериальными клетками.

Важная роль в распространении антибиотикорезистентности среди бактерий принадлежит мобильным генетическим элементам (МГЭ): R-плазмидам (от *англ.* resistance — устойчивость), транспозонам (Tn), инсерционным последовательностям (IS — Insertion Sequences, ISCR — Insertion Sequences with Common Region) [37, 38].

Установлено, что штаммы *E. coli*, устойчивые к тетрациклину, передали устойчивость более чем 70% изначально восприимчивых штаммов *E. coli* всего за три часа путем конъюгативной передачи трансмиссивной R-плазмиды [39].

Транспозоны — категория МГЭ, могут перестраиваться по различным участкам генома как внутри-, так и межмолекулярно, обеспечивая мобильность ARG (antibiotic resistance genes) [40]. Например, Tn5 кодирует устойчивость *A. baumannii* и *Paeruginosa* к неомицину и канамицину, Tn903, Tn6, Tn1525, Tn1699, Tn2350, Tn4350 обуславливают резистентность указанных бактерий к канамицину, неомицину, мономицину, ливидомицину. Устойчивость *E. coli* к тетрациклину связана с наличием Tn10, к хлорамфениколу — транспозона Tn9 [41, 42].

В сравнении со сложными полупаразитарными последовательностями — транспозонами, которые присутствуют в единичном экземпляре, инсерционные последовательности (IS) существуют в виде множественных копий, что способствует накоплению генов антибиотикорезистентности. В результате ряда исследований обнаружена определяющая роль IS-последовательностей в формировании резистентности к колистину и карбапенемам [37, 38]. Эти подвижные элементы играют ключевую роль в усилении и экспрессии многих генов, опосредующих антибиотикорезистентность [43, 44, 45].

Ещё одним весьма эффективным вариантом противостояния микробов антибиотикам является формирование ассоциаций микроорганизмов, примером которых служат биоплёнки [46, 47].

Биоплёнки представляют собой микробные сообщества, прикрепленные на биотической или абиотической поверхности, заключенные в полимерный матрикс, который затрудняет доступ лекарственных средств к бактериальным клеткам, при этом обеспечивает защиту и стабильность микробного сообщества [48].

Биоплёнкообразующие микроорганизмы характеризуются повышенной выживаемостью в

присутствии антибиотиков, факторов иммунного надзора, антисептиков по сравнению с планктонными клетками [49, 50]. Антибиотики практически неэффективны в борьбе с микробами, растущими в виде биоплёнок [51].

Биоплёночное существование бактерий удобно для осуществления горизонтального переноса генов, в том числе генов антибиотикорезистентности.

В отличие от планктонных форм в биоплёнках чаще образуются специализированные клетки-персистеры (от *англ.* persistence — стойкость). Это связано с недостатком кислорода и питательных веществ, способствующих переходу нормальной клетки в персистентное состояние.

Скорость роста таких клеток очень низкая, вследствие чего они толерантны почти ко всем антибиотикам [52–56].

Появление персистеров с генетически обусловленной резистентностью объясняется повышенной стабильностью мобильных генетических элементов в условиях биоплёночного существования бактерий, а также возникновением мутаций, связанных с высоким уровнем окислительного стресса в биоплёнках [56, 57].

Учитывая вышеизложенное, следует признать, что поиск новых путей предупреждения формирования устойчивости возбудителей к антибиотикам является чрезвычайно важной задачей современной медицинской науки.

Одним из направлений разработки эффективных антибактериальных препаратов является создание видоспецифических программируемых RNA содержащих антибиотиков. Наиболее перспективным в этом направлении является использование малых некодирующих РНК (sRNA), а также систем CRISPR Cas [58].

Короткие некодируемые формы РНК существенно воздействуют на синтез факторов вирулентности и в регуляции углеродного, аминокислотного и железного обмена. РНК в виде коротких антисмысловых олигонуклеотидов (ASOs) являются ориентиром для антимикробных препаратов на основе РНК.

Антисмысловые олигонуклеотиды воздействуют на подавление экспрессии генов, необходимых для роста и размножения бактерий, а также на гены, отвечающие за устойчивость к лекарственным препаратам. Восстановление чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам — одна из задач антисмысловой технологии.

В качестве антисмысловых олигонуклеотидов используются видоизмененные, нуклеиновые кислоты с повышенной стабильностью и устойчивостью к нуклеазам: заблокированная нуклеиновая кислота, фосфородиамидатные морфолино олигомеры, пептидная нуклеиновая кислота [59]. На микроорганизмах: *Acinetobacter*, *Brucella*, *Burk-*

*holderia, Campylobacter, Haemophilus, Klebsiella, Pseudomonas, Salmonella, Enterococcus, Listeria, Staphylococcus* и *Streptococcus* spp. были протестированы антибиотики на основе ASOs в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [60].

CRISPR-Cas-система обнаружена у большинства бактерий и архей, отвечает за формирование адаптивного иммунитета и состоит из двух блоков: CRISPR кассеты и кластера генов *cas*. CRISPR кассета (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) представляет собой серию палиндромных повторов нуклеотидов, соединенных уникальными последовательностями ДНК (спейсерами). *Cas*-гены (от англ. CRISPR-associated — ассоциированный с CRISPR) кодируют белки, ответственные за встраивание спейсеров и уничтожение идентичных последовательностей. Детальное исследование стрептококковой CRISPR-Cas системы определило широкий спектр применения данного инструмента. Генетические конструкции позволяют создавать модельные системы для изучения патогенеза и лечения рака, генетических заболеваний, для улучшения свойств сельскохозяйственных растений и животных, для контроля распространения инфекций, переносимых животными; для этого необходимы новые способы разработки направленной эволюции биомолекул [61, 62].

Известно, что разработанные системы CRISPR-Cas повышают чувствительность бактериальных клеток к антибиотикам. Стратегия борьбы с устойчивостью к противомикробным препаратам с использованием CRISPR (т.е. Cas9, Cas12, Cas13 и Cas14) основана на избирательной атаке генов антибиотикорезистентности [63, 64]. В исследованиях подтверждена роль системы CRISPR-Cas в восстановлении чувствительности золотистого стафилококка к канамицину и метициллину [65, 66]. Установлено, что генетически отредактированные бактерии восстановили чувствительность к ампициллину, цефазолину, цефуроксиму, цефтриаксону и цефотаксиму [67]. Группа авторов по аналогии разработала систему rCasCure, которая вырезает и очищает гены карбапеназы (*bla* NDM, *bla* KPC и *bla* OXA-48) у устойчивых к карбапенемам энтеробактерий (CRE) [68]. Определена система CRISPR, которая является мультифокальной и одновременно способна удалять несколько плазмид, несущих гены лекарственной устойчивости [69].

Помимо повышения чувствительности патогенных бактерий к антибиотикам, система CRISPR-Cas способна оказывать прямое дезорганизующее действие на генетический аппарат патогенов, снижая их вирулентность или даже вызывая гибель бактериальных клеток [70, 71].

Гибридные антибиотики представлены комбинацией антибиотиков с разным механизмом действия или антибиотиком, ковалентно связанным с адъювантом. Сочетание антибиотика с хи-

мическим соединением, не обладающим противомикробным действием, позволяет получить синергетический эффект.

По воздействию антибиотиков, ковалентно связанных с адъювантом, их можно разделить следующим образом:

а) *Ингибирование β-лактамаз*. Примерами могут служить комбинации амоксициллина и клавулановой кислоты, авибактам в комбинации с цефтазидимом, имипенем релебактам и меропенем ваборбактам. Группировка цефепима с ингибитором β-лактамаз VNRX-5133VNRX-5133 позволяет повысить антибактериальную активность против Enterobacteriaceae и *Paeruginosa*, устойчивых к антибиотикам группы бета-лактамов [72, 73].

б) *Ингибирование эффлюксных насосов*. Ингибиторы эффлюксных насосов — небольшие молекулы, которые не обладают антибактериальной активностью, но могут оказывать синергическое влияние на антибиотическую активность препаратов. Отмечено, что объединение макролидных, фторхинолоновых и тетрациклиновых антибиотиков с ингибиторами эффлюксного насоса имеет высокую антибактериальную активность в отношении *Mycobacterium aurum* и *Mycobacterium bovis* BCG, что позволяет рассматривать их как перспективный адъювант противотуберкулезных препаратов, значительно повышающий эффективность терапии [74].

в) *Регуляцию проницаемости мембраны бактерий*. Пермеабиллизаторы (пермеабиллизующие агенты) представляют собой химические соединения, которые дестабилизируют стенку мембраны и увеличивают пенетрацию антибиотика. Такие химические соединения включают хелатирующие агенты, полимиксины, аминогликозиды, катионные пептиды, катионные производные желчных кислот или полиамины.

Повышение внутриклеточной концентрации лекарственного средства может быть достигнуто путём конструирования гибридных антибиотиков, меченых хелатирующим железом сидерофором [75]. Так, комбинированный препарат, содержащий β-лактамазный ингибитор GT 055 и цефалоспорин, конъюгированный с сидерофором, GT 1 продемонстрировал высокую активность в отношении мультирезистентных штаммов *E.coli* и *K.pneumoniae*, включая мутантные штаммы по поринам и эффлюксной системе. Усиление действия GT 055 при добавлении GT 1 отмечалось и в отношении мультирезистентных штаммов *A.baumannii* и *Paeruginosa* [76, 77].

г) *Ингибирование патогенности бактерий*. Разрабатываемые антимикробные препараты нового поколения в отличие от традиционных антибиотиков, действие которых направлено на подавление роста и размножения бактерий, воз-

действуют на факторы патогенности микробной клетки, это может быть достигнуто различными способами, включая воздействие на биосинтез цистеина, белки сигнализации кворума (QS) и компоненты биоплёнки.

Так, например, применение N ацетилцистеина в качестве адьюванта при проведении антибиотикотерапии повысило эффективность эрадикации *Helicobacter pylori* [78]. Отмечается перспективность использования ингибиторов биосинтеза цистеина в борьбе с бактериями-персисторами [79, 80].

QS — это механизм межклеточной коммуникации, который регулирует экспрессию фенотипов, включая патогенность. Разработка химических соединений, имитирующих структуры сигнальных молекул (аутоиндукторов), представляет собой одно из современных перспективных направлений преодоления антибиотикорезистентности. Так, например, синтезированный пептид 31, ингибируя QS, с участием сигнальных пептидов способен координировать и подавлять межклеточные взаимодействия [81].

Синтетические катионные пептиды [82] обладают широким спектром активности и могут быть использованы в качестве дополнения к традиционным антибактериальным препаратам, таким как тобрамицин, цефтазидим, имипенем и цiproфлоксацин [83]. Они способны нарушать биоплёночную архитектуру, вызывая дезорганизацию матрикса, а также ингибируют гены, участвующие в образовании биоплёнки и подвижности связывающих белков большинства бактерий [84].

Одним из перспективных альтернативных антимикробных агентов являются пептидогликангидролазы (ПГГ) [85]. Разновидностью ПГГ являются эндолизины, кодируемые геном вирулентного бактериофага. Рекомбинантные эндолизины бактериофагов обладают устойчивым конкурентным преимуществом активного, быстро механизма бактериолиза и достигают максимальной эффективности против устойчивых к антибиотикам грамположительных бактерий и биоплёнок [86]. Их преимущества заключаются в том, что они действуют только на определённые виды бактерий, они нетоксичны для эукариотических клеток и имеют низкий риск развития резистентности благодаря узконаправленной природе эндолизинов [87].

**Антибиотические адьюванты, направленные на иммунную систему хозяина.** Перспективно создание гибридных антибиотиков с иммуномодулирующей активностью. Действие тобрамицина с многогранным механизмом антимикробной активности нейтрализует 30S субъединицу рибосомы, подавляя синтез белка, блокируя эффективные каналы, и при высоких концентрациях нарушает целостность бактериальной мембраны,

вызывая гибель клетки. [88]. Он в сочетании с алифатическими углеводородами оказывает иммуномодулирующее действие, особенно в макрофагах, избирательно индуцируя хемокин интерлейкин (IL- 8), способствуя активации полиморфноядерных лейкоцитов, что приводит к эффективному уничтожению патогенов в организме [89].

Особое положение среди средств, которые рассматриваются как возможная альтернатива антибиотикам, занимают бактериофаги.

Очевидные плюсы фаготерапии:

- строгая специфичность без подавления нормальной микрофлоры организма, что предупреждает развитие дисбиоза;
- саморегуляция концентрации бактериофагов в очаге инфекции;
- быстрое проникновение бактериофагов в очаг инфекции: при пероральном приёме фаги попадают в кровь через 1 ч, через 1–1,5 ч выявляются в бронхолёгочном экссудате, через 2 ч — в моче и ликворе;
- стимуляция иммунитета пациента, что особенно важно при лечении хронических воспалительных заболеваний;
- отсутствие токсического действия и аллергических реакций;
- могут быть использованы для лечения инфекций у новорождённых и беременных;
- риск развития у бактерий приобретённой устойчивости к бактериофагам минимален;
- эффективность препаратов бактериофагов как при монотерапии, так и в комбинации с антибиотиками, в том числе в отношении полирезистентных бактерий;
- стабильность фаговых препаратов при длительном хранении [90].

Противопоказанием к применению бактериофагов является повышенная чувствительность к компонентам препарата. Для эффективной фаготерапии необходимо предварительное определение литической активности фага и чувствительности к нему возбудителя.

**Наноповёрхности.** Повышение уровня здравоохранения и качества жизни пациентов в последние годы неразрывно связаны с развитием медицинских технологий и расширением диапазона применения имплантируемых медицинских устройств.

Одним из опасных осложнений оперативных вмешательств подобного рода является развитие имплантат-ассоциированных инфекций. Их доля среди инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), составляет около 60–70% [91].

Современные имплантируемые поверхности должны соответствовать требованиям биосовместимости с тканями организма человека, а также обладать антибактериальными свойствами. Су-



ществует четыре типа поверхностей с различными механизмами противомикробной активности:

- высвобождение бактерицидных агентов,
- антиадгезия (препятствие сорбции бактерий на поверхности),
- локальное изменение pH,
- гибель бактерий при непосредственном контакте бактерий с поверхностью.

Наночастицы многих металлов — перспективные антибактериальные агенты для преодоления антибиотикорезистентности, обладающие широкой антимикробной активностью.

Наночастицы серебра рассматриваются как альтернатива антибиотикам. Они доставляют терапевтические агенты, воздействуют на мембраны микробных клеток, нарушая их жизнедеятельность и приводя к гибели. Было отмечено, что ионы серебра усиливают антимикотическую активность амфотерицина В [92]. Носители нитрида бора имеют сферическую форму с игольчатой поверхностью, что позволяет разрывать мембрану бактериальных клеток при контакте с ними.

Использование модифицированных антибиотиками биodeградируемых нанополимеров считается перспективным для лечения раневых поверхностей, в связи с их выраженной бактерицидной активностью и длительным сроком действия [93, 94].

## Заключение

Формирование поли- и панрезистентных штаммов бактерий к существующим антимикробным препаратам, отсутствие в последние десятилетия принципиально новых классов антибиотиков создают серьёзную угрозу для человечества в целом. Знание молекулярных механизмов формирования устойчивости микроорганизмов позволяет разработать стратегические направления её преодоления. Особо перспективным в последние годы считается использование РНК содержащих антибиотиков и CRISPER–Cas систем, преимущество которых является технологическая простота получения, незначительные вре-

менные затраты для изготовления генетических конструкций и высокая эффективность вследствие максимальной таргетированности на гены резистентности, и возможности поражения нескольких мишеней одновременно. Сохраняет свою актуальность применение гибридных антибиотиков как вариант комплексной противомикробной терапии, нанопервохностей с антибактериальной, фунгицидной и иммуномодулирующей активностью. В поиске новых средств противостояния особо опасным микробам ESCAPE снова обращают на себя внимание бактериофаги как природный естественный антимикробный фактор, который может быть рассмотрен как дополнение или альтернатива существующим антибиотикам. Перспективным считается применение основного действующего фактора вируса бактерий – эндолизина как в чистом виде, так и в составе гомодимеров, например, лизобелка, представляющего собой комплекс эндолизина с иммуноглобулинами человека. Фаготерапия будущего — это персонализированная фаготерапия, требующая создания библиотеки или банка фагов.

Преодоление резистентности, являясь глобальной проблемой, требует кардинально новых подходов на высоком методологическом и технологическом уровне. Работа по снижению уровня резистентности микроорганизмов к антибиотикам, рациональное использование антимикробных препаратов, совершенствование схем их применения, разработка новых антибактериальных средств является чрезвычайно важной, востребованной задачей современности и требует всеобщего внимания и комплексного подхода.

## Дополнительная информация

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

## Литература/References

1. *Davies J., Davies D.* Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74 (3): 417–433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
2. *Singh S.B.* Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24 (16) 3683–3689. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.06.053.
3. *Fair R.J., Tor Y.* Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21<sup>st</sup> Century. *Perspect Med Chem.* 2014; 6 (6): 25–64. doi: 10.4137/PMC.S14459.
4. *Spellberg B., Gilbert D.N.* The Future of Antibiotics and Resistance: A Tribute to a Career of Leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis.* 2014; 59 (2): 71–75. doi: 10.1093/cid/ciu392.
5. *Reder-Christ K., Bendas G.* Biosensor applications in the field of antibiotic research a. review of recent developments. *Sensors.* 2011; 11 (10): 9450–9466. doi: 10.3390/s111009450.
6. *Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J.V.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13 (1): 42–51. doi: 10.1038/nrmicro3380.

7. *Bush K., Courvalin P., Dantas G., Davies J., Eisenstein B., Huovinen P., Jacoby G.A., Kishony R., Kreiswirth B.N., Kutter E. et al.* Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9 (2): 894–896. doi: 10.1038/nrmicro2693.
8. *Barriere S.L.* Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. *Expert Opin Pharmacother.* 2015; 116 (2): 151–153. doi: 10.1517/14656566.2015.983077. Epub 2014 Dec 6.
9. *Watkins R.R., Bonomo R.A.* Overview: global and local impact of antibiotic resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016; 30 (2): 313–322. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.001.
10. *Кулагина Л.Ю., Валиуллина И.Р., Кадысева Э.Р., Шикалева А.А.* Особенности антибиотикорезистентности по данным микробиологического мониторинга в многопрофильном стационаре. *Практическая медицина.* 2021; 19 (4): 79–83. [*Kulagina L.Ju., Valiullina I.R., Kadyseva Je.R., Shikaleva A.A.* Features of antibiotic resistance according to microbiological monitoring data in a multidisciplinary hospital. *Practical Medicine.* 2021; 19 (4): 79–83. (in Russian)]

11. Cooper R.M., Tsimring L., Hasty J. Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *Elife*. 2017; 6. doi: 10.7554/eLife.25950.
12. Admassie M. Current Review on Molecular and Phenotypic Mechanism of Bacterial Resistance to Antibiotic. *Sci J Clin Med*. 2018; 7 (2): 13. doi: 10.11648/j.sjcm.20180702.11.
13. Miller W.R., Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014; 12 (10): 1221–1236. doi: 10.1586/14787210.2014.956092.
14. Ghai I., Ghai S. Exploring bacterial outer membrane barrier to combat bad bugs. *Infect Drug Resist*. 2017; 10: 261–273. doi: 10.2147/idr.s144299.
15. 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 (обзор). *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. Molekulyarnye mekhanizmy i geneticheskie determinanty ustoychivosti k antibakterial'ny'm preparatam u mikroorganizmov (obzor). *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya*. 2022; 57 (2): 237–256. doi: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.2.237rus>. (in Russian)]
16. Vergalli J., Bodrenko I.V., Masi M., Moynié L., Acosta-Gutiérrez S., Naismith J.H., Davin-Regli A., Ceccarelli M., van den Berg B., Winterhalter M., Pagès J.M. Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2020; 18 (3): 164–176. doi: 10.1038/s41579-019-0294-2.
17. Pandey A., Agnihotri V. Antimicrobials from medicinal plants: research initiatives, challenges, and the future prospects. *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications in Food and Pharmaceuticals*. John Wiley & Sons, Ltd. 2015; 123–150. <https://doi.org/10.1002/9781118733103.ch5>.
18. Wall B.A., Mateus A., Marshall L., Pfeiffer D.U., Lubroth J., Ormel H.J., Otto P., Patriarchi A. Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production. *FAO*. 2016; 68.
19. Bush N.G., Diez-Santos I., Abbott L.R., Maxwell A. Quinolones: mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules*. 2020; 25 (23): 5662. doi: 10.3390/molecules25235662.
20. Mayer C., Takiff H. The molecular genetics of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr*. 2014; 2 (4): MGM2-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0009-2013.
21. Hawkey P.M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *Brit Med J*. 1998; 317 (7159): 657–660. doi: 10.1136/bmj.317.7159.657.
22. Шкурат М.А., Покудина И.О., Батталов Д.В. Резистентность микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Живые и биокосные системы: электронный журнал. 2014; 10. <http://jbks.ru/archive/issue-10/article-10>. [Shkurat M.A., Pokudina I.O., Battalov D.V. Reizistentnost' mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam. Zhivye i biokosnyye sistemy: elektronnyy zhurnal. 2014; 10. URL: <http://jbks.ru/archive/issue-10/article-10>. (in Russian)]
23. Schroeder M., Brooks B.D., Brooks A.E. The Complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes*. 2017; 8 (1): 23. doi: 10.3390/genes8010039.
24. Wilson D.N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2014; 12 (1): 35–48. doi: 10.1038/nrmicro3155
25. Valderrama-Carmona P., Cuartas J.H., Castaño D.C., Corredor M. The role of *Pseudomonas aeruginosa* RNA methyltransferases in antibiotic resistance. In: *Pseudomonas Aeruginosa — an armory within*. D. Sriramulu (ed.). IntechOpen, London. 2019. doi: 10.5772/intechopen.85185.
26. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39 (3): 577–585.
27. Sultan I., Rahman S., Jan A.T., Siddiqui M.T., Mondal A.H., Haq Q. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Front Microbiol*. 2018; 9: 2066. doi: 10.3389/fmicb.2018.02066.
28. Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*. 2020; 25 (6): 1340. doi: 10.3390/molecules25061340.
29. Cassini A., Högberg L.D., Plachouras D., Quattrocchi A., Hoxha A., Simonsen G.S., Colomb-Cotinat M., Kretzschmar M.E., Devleeschauwer B., Cecchini M. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019; 19: 56–66. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
30. Tran T.T., Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of Drug Resistance: Daptomycin Resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2015; 1354 (1): 32–53. doi: 10.1111/nyas.12948.
31. Tran T.T., Miller W.R., Shamoo Y., Arias C.A. Targeting cell membrane adaptation as a novel antimicrobial strategy. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 33: 91–96. doi: 10.1016/j.mib.2016.07.002.
32. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54 (3): 969–976. doi: 10.1128/aac.101009-09.
33. Lorenz M.G., Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*. 1994; 58 (3): 563–602. doi: 10.1128/mr.58.3.563-602.1994.
34. Shintani M. The behavior of mobile genetic elements (MGEs) in different environments. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2017; 81(5): 854–862. doi: 10.1080/09168451.2016.1270743.
35. Lermintiaux N.A., Cameron A.D.S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol*. 2019; 65 (1): 34–44. doi: 10.1139/cjm-2018-0275.
36. Guglielmetti E., Korhonen J.M., Heikkinen J., Morelli L., Von Wright A. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. *Fems Microbiol Lett*. 2009; 293 (1): 28–34. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01512.x
37. Земляно О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам. Экологическая генетика. 2018; 16 (3): 4–17. doi: <https://doi.org/10.17816/ecogen1634-17>. [Zemlyanko O.M., Rogozha T.M., Zhuravleva G.A. Mekhanizmy mnozhestvennoy ustoychivosti bakteriy k antibiotikam. *Ekologicheskaya Genetika*. 2018; 16 (3): 4–17. doi: <https://doi.org/10.17816/ecogen1634-17> (in Russian)]
38. Vrancianu C.O., Popa L.I., Bleotu C., Chifiriuc M.C. Targeting plasmids to limit acquisition and transmission of antimicrobial resistance. *Front Microbiol*. 2020; 11: 761. doi: 10.3389/fmicb.2020.00761.
39. Nolvos S., Cayron J., Dedieu A., Page A., Delolme F., Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. *Science*. 2019; 364 (6442): 778–782. doi: 10.1126/science.aav6390.
40. Babakhani S., Oloomi M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol*. 2018; 58 (11): 905–917. doi: 10.1002/jobm.201800204.
41. Bello-López J.M., Cabrero-Martínez O.A., Ibáñez-Cervantes G., Hernández-Cortez C., Pelcastre-Rodríguez L.I., González-Avila L.U., Castro-Escarpullí G. Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *Aeromonas* spp. *Microorganisms*. 2019; 7 (9): 363. doi: 10.3390/microorganisms7090363.
42. Молчанова Е.В., Агеева Н.П. Изучение возможности конъюгационной передачи плазмиды Rts1-Tn9 от *Escherichia coli* штаммам *Burkholderia thailandensis* и *Burkholderia cepacia*. *Вестник ВолгГМУ*. 2013; 4: 55–57. [Molchanova E.B., Ageyeva N.P. Izucheniye vozmozhnosti kon'yugatsionnoy peredachi plazmidy Rts1-Tn9 ot *Escherichia coli* shtammam *Burkholderia thailandensis* i *Burkholderia Cepacia*. *Vestnik VolgGMU*. 2013; 10 (4): 55–57. (in Russian)].
43. Couchoud C., Bertrand X., Valot B., Hocquet D. Deciphering the role of insertion sequences in the evolution of bacterial epidemic pathogens with panISa software. *Microb Genom*. 2020; 6 (6): e000356. doi: 10.1099/mgen.0.000356.
44. Razavi M., Kristiansson E., Flach C.F., Larsson D.G.J. The association between insertion sequences and antibiotic resistance genes. *mSphere*. 2020; 5 (5): e00418–20. doi: 10.1128/mSphere.00418-20.
45. Che Y., Yang Y., Xu X., Břinda K., Polz M.F., Hanage W.P., Zhang T. Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021; 118 (6): e2008731118. doi: 10.1073/pnas.2008731118.
46. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гунцбург А.Л. Генетика. 2004; 40 (11): 1445–1456. [Il'ina T.S., Romanova YU.M., Gintsburg A.L. *Genetika*. 2004; 40 (11): 1445–1456. (in Russian)]
47. Rodney M.D. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8 (9): 881–890. doi: 10.3201/eid0809.020063.
48. Hartmann R., Singh P.K., Pearce P., Mok R., Diaz-Pascual F., Dunkel J., Drescher K. Emergence of three-dimensional order and structure in growing biofilms. *Nat Phys*. 2019; 15 (3): 251–256. doi: 10.1038/s41567-018-0356-9.
49. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2 (2): 114–122. doi: <https://doi.org/10.1038/nrd1008>.
50. Ильина Т.С., Романова Ю.М. Бактериальные биопленки: роль в хронических инфекционных процессах и поиск средств борьбы с ними. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2021; 39 (2): 14–24. doi: <https://doi.org/10.17116/molgen20213902114>. [Il'ina T.S., Romanova Yu.M. Bakterial'nyye bioplenki: rol' v khronicheskikh infektsionnykh protsessakh i poisk sredstv bor'by s nimi. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya*. 2021; 39 (2): 14–24. doi: <https://doi.org/10.17116/molgen20213902114>. (in Russian)]

51. Hall C.W., Mah T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41 (3): 276–301. doi: 10.1093/femsre/fux010.15.
52. Jakobsen T.H., Tolker-Nielsen T., Givskov M. Bacterial biofilm control by perturbation of bacterial signaling processes. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (9): 1970. doi: 10.3390/ijms18091970.16.
53. Flemming H.C., Neu T.R., Worniak D.J. The EPS matrix: the «house of biofilm cells». *J Bacteriol.* 2007; 189 (22): 7945–7947. doi: 10.1128/JB.00858-07. Epub 2007 Aug 3.
54. Fischer R.A., Gollan B., Helaine S. Persister bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 2017; 15 (8): 453–464. doi: 10.1038/nrmicro.2017.42.
55. Defraigne V., Fauwart M., Michiels J. Fighting bacterial persistence: current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resist Updat.* 2018; 38: 12–26. doi: 10.1016/j.drug.2018.03.002.21.
56. Cohen N.R., Lobritz M.A., Collins J.J. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe.* 2013; 13 (6): 632–642. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.009.
57. Fischer R.A., Gollan B., Helaine S. Persister bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 2017; 15 (8): 453–464. doi:10.1038/nrmicro.2017.42.20.
58. Шемякин И.Г., Фирстова В.В., Фурсова Н.К., Абаев И.В., Филиппович С.Ю., Игнатов С.Г. и др. Новые возможности в борьбе с патогенными микроорганизмами. *Биохимия.* 2020; 85 (11): 1615–1632. [Shemyakin I.G., Firsova V.V., Fursova N.K., Abaev I.V., Filippovich S.Yu., Ignatov S.G. et al. New opportunities in the fight against pathogenic microorganisms. *Biokhimiya.* 2020; 85 (11): 1615–1632. (in Russian)]
59. Xue X.Y., Mao X.G., Zhou Y., Chen Z., Hu Y., Hou Z., Li M.K., Meng J.R., Luo X.X. Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases. *Nanomedicine.* 2017; 14 (3): 745–758. doi: 10.1016/j.nano.2017.12.026.
60. Daly S.M., Sturge C.R., Marshall Batty K.R., Felder Scott C.F., Jain R., Geller B.L., Greenberg D.E. Antisense inhibitors retain activity in pulmonary models of Burkholderia infection. *ACS Infect Dis.* 2018; 4 (5): 806–814. doi: 10.1021/acscinfed.7b00235.
61. Ma X., Zhu Q., Chen Y., Liu Y-G. CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Mol Plant.* 2016; 9 (7): 961–974. doi: 10.1016/j.molp.2016.04.009.
62. Wu Y., Battalapalli D., Hakeem M.J. et al. Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections. *J Nano-biotechnol.* 2021; 19 (1): 401. doi: 10.1186/s12951-021-01132-8.
63. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007; 315 (5819): 1709–1712.
64. Greene A.C. CRISPR-based antibacterials: transforming bacterial defense into offense. *Trends Biotechnol.* 2018; 36 (2): 127–130. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.10.021.
65. Bikard D., Euler C.W., Jiang W., Nussenzweig P.M., Goldberg G.W., Duportet X. et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol.* 2014; 32 (11): 1146–1150. doi: 10.1038/nbt.3043. Epub 2014 Oct 5.
66. Kang Y.K., Kwon K., Ryu J.S., Lee H.N., Park C., Chung H.J. Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance. *Bioconjug Chem.* 2017; 28 (4): 957–967. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00676.
67. Tagliaferri T.L., Guimarães N.R., Pereira M.P.M., Vilela L.F.F., Horz H.P., Dos Santos S.G. et al. Exploring the potential of CRISPR-Cas9 under challenging conditions: facing high-copy plasmids and counteracting beta-lactam resistance in clinical strains of enterobacteriaceae. *Front Microbiol.* 2020; 11: 578. doi: 10.3389/fmicb.2020.00578. eCollection 2020.
68. Hao M., He Y., Zhang H., Liao X.P., Liu Y.H., Sun J. et al. CRISPR-Cas9-mediated carbapenemase gene and plasmid curing in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64 (9): e00843–20. doi: 10.1128/AAC.00843-20.
69. Yosef I., Manor M., Kiro R., Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112 (23): 7267–7272. doi: 10.1073/pnas.1500107112.
70. Vercoe R.B., Chang J.T., Dy R.L., Taylor C., Gristwood T., Clulow J.S. et al. Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR. Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands. *PLoS Genet.* 2013; 9 (4): e1003454. doi: 10.1371/journal.pgen.1003454
71. Citorik R.J., Mimee M., Lu T.K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol.* 2014; 32 (11): 1141–1145. doi: 10.1038/nbt.3011.
72. Zhanel G.G., Lawrence C.K., Adam H., Schweizer F., Zelenitsky S. et al. Imipenem relebactam and meropenem vaborbactam: two novel carbapenem  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *Drugs.* 2018; 78 (1): 65–98. doi: <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0851-9>.
73. Mo Y., Lorenzo M., Farghaly S., Kaur K., Housman S. T. What's new in the treatment of multidrug resistant gram-negative infections? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019; 93 (2): 171–181. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.007.
74. Tran H.T., Solnier J., Pferschy-Wenzig E.M., Kunert O., Martin L. et al. Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of carvotacetones from *Sphaeranthus africanus* against mycobacteria. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9 (7): 390. doi: 10.3390/antibiotics9070390.
75. Negash K.H., Norris J.K.S., Hodgkinson J.T. Siderophore antibiotic conjugate design: new drugs for bad bugs? *Molecules.* 2019; 24 (18): 3314. doi: 10.3390/molecules24183314.
76. Tonziello G., Caraffa E., Pinchera B., Granata G., Petrosillo N. Present and future of siderophore based therapeutic and diagnostic approaches in infectious diseases. *Infect Dis Rep.* 2019; 11 (2): 8208. doi: 10.4081/idr.2019.8208.
77. Nguyen L.P., Pinto N.A., Vu T.N., Lee H., Cho Y.L., Byun J.H., D'Souza R., Yong D. *In vitro* activity of a novel siderophore cephalosporin, GT 1 and serine type  $\beta$ -lactamase inhibitor, GT 055, against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* spp. panel strains. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9 (5): 267. doi: 10.3390/antibiotics9050267.
78. Fontes L.E.S., Martimbianco A.L.C., Zanin C., Riera R.N. Acetylcysteine as an adjuvant therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019; 2 (2): CD012357. doi: 10.1002/14651858.CD012357.pub2.
79. Turnbull A.L., Surette M.G.L. Cysteine is required for induced antibiotic resistance in actively swarming *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Microbiology (Reading).* 2008; 154 (11): 3410–3419. doi: 10.1099/mic.0.2008/020347-0.
80. Huber A., Hajdu D., Bratschun-Khan D., Gáspári Z., Varbanov M., Philippot S. et al. New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: a cationic, cysteine rich protein from *Penicillium chrysogenum* Q176. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 1–16. doi: 10.1038/s41598-018-20002-2.
81. Schütz C., Empting M. Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers. *Beilstein J Org Chem.* 2018; 14 (1): 2627–2645. doi: 10.3762/bjoc.14.241.
82. Overhage J., Campisano A., Bains M., Torfs E.C.W., Rehm B.H.A., Hancock R.E.W. Human host defense peptide LL 37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun.* 2008; 76 (9): 4176–4182. doi: 10.1128/IAI.00318-08.
83. Refruwelle F., de la Fuente-Núñez C., Mansour S., Hancock R.E.W. A broad spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58 (9): 5363–5371. doi: 10.1128/AAC.03163-14.
84. Pletzer D., Coleman S.R., Hancock R.E. Antibiofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 33: 35–40. doi: 10.1016/j.mib.2016.05.016.
85. Nelson D.C., Schmelcher M., Rodriguez Rubio L., Klumpp J., Pritchard D.G., Dong S., Donovan D.M. Endolysins as antimicrobials. *Adv Virus Res.* 2012; 83: 299–365. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00007-4.
86. Nakamura T., Kitana J., Fujiki J., Takase M., Iyori K., Simoike K., Iwano H. Lytic activity of polyvalent staphylococcal bacteriophage PhiSA012 and its] endolysin Lys PhiSA012 against antibiotic resistant staphylococcal clinical isolates from canine skin infection sites. *Front. Med.* 2020; 7: 234. doi: 10.3389/fmed.2020.00234.
87. Gerstmann H., Criel B., Briens Y. Synthetic biology of modular endolysins. *Biotechnol Adv.* 2018; 36 (3): 624–640. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.009.
88. Gorityala B.K., Guchhait G., Goswami S., Fernando D.M., Kumar A., Zhanel G.G., Schweizer F. Hybrid antibiotic overcomes resistance in *P. aeruginosa* by enhancing outer membrane penetration and reducing efflux. *J Med Chem.* 2016; 59 (18): 8441–8455. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00867.
89. Laselva O., Stone T.A., Bear C.E., Deber C.M. Anti-infectives restore OR-KAMBI® rescue of F508del CFTR function in human bronchial epithelial cells infected with clinical strains of *Paeruginosa*. *Biomolecules.* 2020; 10 (2): 334. doi: 10.3390/biom10020334.
90. Кузьмин В.Н. Антибиотикорезистентность как эпидемиологическая проблема инфекционно-воспалительных заболеваний в современных условиях. *Медицинский оппонент.* 2020; 3 (11): 20–26. [Kuz'min V.N. Antibiotic resistance as an epidemiological problem of infectious and inflammatory diseases in modern conditions. *Medical Opponent.* 2020; 3 (11): 20–26. (in Russian)].
91. Bryers J.D. Medical Biofilms. *Biotechnol Bioeng.* 2008; 100 (1): 1–18. doi: 10.1002/bit.21838.
92. Sukhorukova I.V., Sheveyko A.N., Manakhov A., Zhitnyak I.Y., Gloushankova N.A. et al. Synergistic and long lasting antibacterial effect of antibiotic

loaded TiCaPCON Ag films against pathogenic bacteria and fungi. Mater Sci Eng. 2018; 90: 289–299. doi: 10.1016/j.msec.2018.04.068.

93. Cloutier M., Mantovani D., Rosei F. Antibacterial coatings: challenges, perspectives, and opportunities. Trends Biotechnol. 2015; 33 (11): 637–652. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.09.002.

## Информация об авторах

*Даудова Адилья Джигангировна* — к. м. н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8607-2395

*Демина Юлия Заурбековна* — ассистент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0428-2570.

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

*Абдрахманова Радмила Охасовна* — ассистент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0536-8149

*Баева Гузель Ренатовна* — младший научный сотрудник Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия.

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

*Рубальский Олег Васильевич* — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2904-9276

94. Permyakova E. S., Polčák J., Slukin P. V., Ignatov S. G., Gloushankova N. A., Zajíčková, L. Shtansky D. V., Manakhov A. Antibacterial biocompatible PCL nanofibers modified by COOH anhydride plasma polymers and gentamicin immobilization. Materials & Design. 2018; 153: 60–70. doi: 10.1016/j.matdes.2018.05.002.

## About the authors

*Adilya D. Daudova* — Ph. D. in Medicine, Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8607-2395

*Yuliya Z. Demina* — Assistant of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0428-2570

*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 Russia, Astrakhan, Russia. ORCID: 0000-0001-5417-4477

*Radmila O. Abdrakhmanova* — Assistant of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0536-8149

*Guzel R. Baeva* — Junior researcher Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia

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

*Oleg V. Rubalsky* — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2904-9276

# Обоснование сочетанного применения терапии отрицательным давлением и меглюмина натрия сукцината при лечении ран различной этиологии

\*М. В. ВАРГАНОВ, А. А. МИКЛИЧЕВ, И. В. СВИДЕРСКИЙ

ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, Ижевск, Россия

## Substantiation of the Combined Use of Negative Pressure Therapy and Meglumine Sodium Succinate in the Treatment of Wounds of Various Etiologies

\*MIKHAIL V. VARGANOV, ALEXEY A. MIKLCHEV, ILYA V. SVIDERSKY

Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia

### Резюме

В обзоре представлено теоретическое обоснование эффективности включения в комплексную терапию ран различной этиологии NPWT-терапии местно и меглюмина натрия сукцината — внутривенно капельно. Приведены биохимические пути, сопровождающие формирования нормоксии и гипоксии различной степени выраженности, значение сукцината в их формировании, в том числе в зависимости от формы его поступления в организм (экзогенный и эндогенный путь). Так, при декомпенсации эндогенной продукции янтарной кислоты наступает торможение цикла трикарбоновых кислот и активация анаэробного гликолиза. В этот момент и до наступления необратимых биохимических повреждений восстановление процессов энергообмена начинает зависеть от сукцината, в том числе и от экзогенного его поступления. К дополнительным, но не менее важным противогипоксическим эффектам экзогенного сукцината относят стимуляцию сукцинатоксидазного окисления янтарной кислоты с восстановлением её потребления в дыхательной цепи митохондрий и возрастанием активности антиоксидантной функции глутатиона, а также стимуляцией белкового метаболизма. Реамберин (меглюмина натрия сукцинат) значительно ускоряет восстановление ткани при гипоксии за счёт своих антигипоксического, цитопротекторного и других эффектов, обусловленных активацией HIF-1α биологически активных факторов.

**Ключевые слова:** терапия отрицательным давлением; NPWT-терапия; реамберин; меглюмина натрия сукцинат; гипоксия

**Для цитирования:** Варганов М. В., Микличев А. А., Свицерский И. В. Обоснование сочетанного применения терапии отрицательным давлением и меглюмина натрия сукцината при лечении ран различной этиологии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 76–83. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-76-83>.

### Abstract

The review presents a theoretical rationale for the effectiveness of including topically NPWT therapy and meglumine sodium succinate intravenously in the complex therapy of wounds of various etiologies. The biochemical pathways accompanying the formation of normoxia and hypoxia of varying severity, the significance of succinate in their formation, including depending on the form of its intake into the body (exogenous and endogenous pathways), are given. Thus, when endogenous production of succinic acid is decompensated, the tricarboxylic acid cycle is inhibited and anaerobic glycolysis is activated. At this moment and before the onset of irreversible biochemical damage, the restoration of energy exchange processes begins to depend on succinate, including its exogenous intake. Additional, but no less important, antihypoxic effects of exogenous succinate include stimulation of succinate oxidase oxidation of succinic acid with the restoration of its consumption in the mitochondrial respiratory chain and an increase in the activity of the antioxidant function of glutathione, as well as stimulation of protein metabolism. Reamberin (meglumine sodium succinate) significantly accelerates tissue recovery during hypoxia due to its antihypoxic, cytoprotective and other effects due to the activation of HIF-1α biologically active factors.

**Keywords:** negative pressure therapy; NPWT therapy; reamberin; meglumine sodium succinate; hypoxia

**For citation:** Varganov M. V., Miklichev A. A., Svidersky I.V. Substantiation of the combined use of negative pressure therapy and meglumine sodium succinate in the treatment of wounds of various etiologies. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 76–83. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-76-83>.

## Введение

Лечение ран, не способных к самостоятельному закрытию, остаётся актуальной проблемой хирургии и комбустиологии. Комплекс терапии должен включать как местное воздействие на раневую поверхность, так и мероприятия, направленные на купирование волемиических и метаболических нарушений и восстановление водно-электролитного и кислотно-щелочного состояний, сопровождающих раневую процесс. При этом стандартные методы лечения могут оказаться недостаточно эффективными, в связи с чем возможно развитие различных осложнений и замедление сроков выздоровления [1].

Среди методов местного воздействия в последнее время всё больше внимания уделяется лечению отрицательным давлением (Negative Pressure Wound Treatment — NPWT). Принцип действия метода основан на поддержании контролируемого отрицательного давления в области раны [2, 3]. Несмотря на достаточно большую базу данных по применению метода, вопрос о его эффективности остаётся дискуссионным [4–6]. По нашим данным, применение NPWT-терапии у пациентов с ранами различной этиологии способствовало более быстрому их заживлению [7, 8].

Одним из основных методов воздействия на гомеостаз организма при различных критических состояниях остаётся инфузионная терапия. При этом необходимо учитывать, что внутривенное введение любых растворов является вмешательством во внутреннюю среду организма, что в той или иной степени влияет на основные показатели водно-электролитного обмена и кислотно-основного состояния и определяет выбор оптимального по составу для конкретного случая лекарственного средства, правильного расчёта объёма инфузии и динамического наблюдения за состоянием пациента. Неадекватное восполнение жидкости является одной из причин развития осложнений и летальности. Одним из вариантов решения проблемы может стать включение в схемы терапии реамберина (меглюмина натрия сукцината) — препарата, обладающего антигипоксическим действием, оказывающего положительный эффект на аэробные процессы в клетке, способствующего уменьшению продукции свободных радикалов и восстановлению энергетического потенциала клеток. Препарат активизирует ферментативные процессы цикла Кребса и способствует утилизации жирных кислот и глюкозы клетками, нормализует кислотно-щелочной баланс и газовый состав крови [9].

*Цель обзора* — обоснование эффективности сочетанного применения NPWT-терапии и меглюмина натрия сукцината в лечении ран различной этиологии.

## Обсуждение

С момента возникновения в ране начинаются биологические и биохимические процессы, связанные с гибелью повреждённых клеток [10]. Происходит каскад процессов: анаэробный гликолиз с накоплением патологических продуктов обмена (гистамина, серотонина, кининов и др.), распад белков, развивается ацидоз и гипоксия тканей. В норме pH тканей организма равен 7,2, но при воспалении, особенно с присоединением микробного компонента, pH может снижаться до 6,5–5,5. Клеточный распад сопровождается накоплением освобождающегося калия, миграцией лейкоцитов из сосудистого русла в рану, развиваются признаки воспаления: расширение сосудов, гиперемия и отёк окружающих тканей. Набухание приводит к разрыву клеточных мембран и вторичной гибели клеток, нарастает клеточный протеолиз, когда под действием протеолитических ферментов ускоряются процессы распада белков некротизированных клеток до пептидов и аминокислот, способствуя лизису некротических тканей и очищению раны.

В классическом описании раневого процесса выделяют три фазы: воспаления, пролиферации и заживления. В воспалительную фазу преобладают катаболические процессы над анаболическими, а в фазу регенерации — анаболические. Катаболический процесс определяется первичным и вторичным некрозом тканей, фагоцитозом, активным протеолизом и проявляется накоплением в ране продуктов распада белка — полипептидов, нуклеопротеидов и др. Анаболические процессы характеризуются превалированием синтеза белка над его распадом: накоплением аминокислоты (тирозин, лейцин, аргинин, гистидин, лизин, триптофан, лейцин, пролин и др.). Активность регенеративных процессов зависит от синтеза и накопления кислых мукополисахаридов, предшествующих образованию коллагена. Химическими соединениями (адениловые кислоты, аденозин и др.), накапливающиеся в ране, вызывают увеличение сосудистой проницаемости и миграцию лейкоцитов. Важнейшими их производными являются аденозиндифосфорная (АДФ) и аденозинтрифосфорная (АТФ) кислоты, которые в реакциях перефосфорилирования переходят друг в друга с освобождением большого количества энергии, используемой для регенеративных процессов. Адениновые кислоты стимулируют миграцию лейкоцитов, их фагоцитарную активность, активируют регенеративные процессы в ране.

В экспериментальных и клинических исследованиях отмечено, что NPWT-терапия положительно влияет на все стадии раневого процесса. Создание в зоне повреждения контролируемого

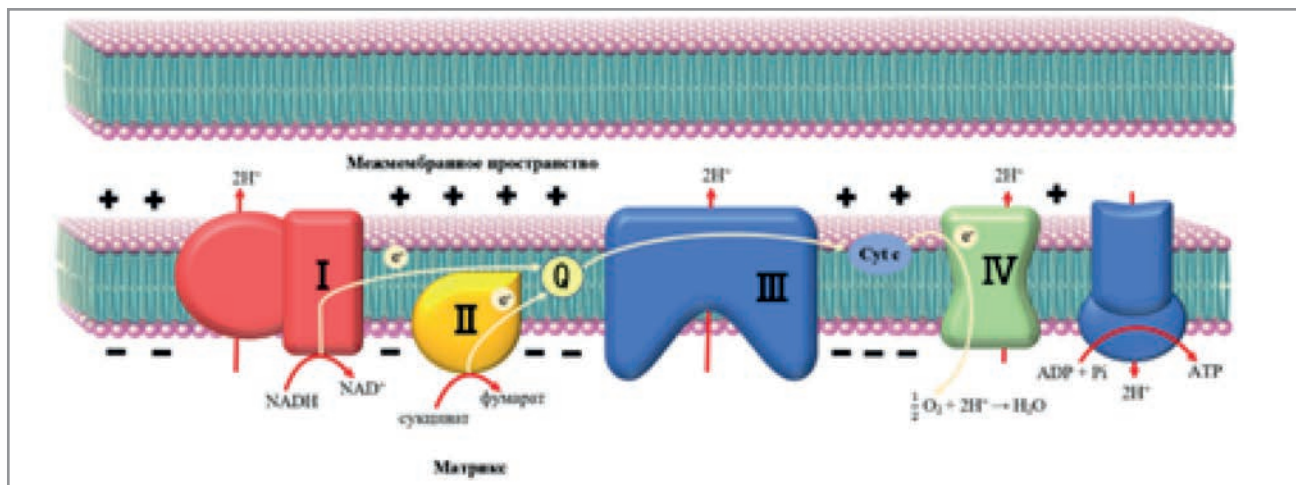


Рис. 1. Схема нормоксии.  
Fig. 1. Normoxia scheme.

отрицательного давления благоприятствует очищению раневого ложа: активная аспирация создаёт поток жидкости, направленный из тканей, что способствует элиминации микробных тел и токсинов, а также препятствует проникновению микроорганизмов в глубжележащие ткани. При этом обсуждение эффективности на основании клинических и экспериментальных данных происходит без уточнения характера раневой гипоксии: ряд авторов указывают на её положительное влияние на ангиогенез и синтез коллагена в культуре *in vitro*, что клинически проявляется созреванием грануляционной ткани и очищением раневого ложа, появлению «сочных» грануляций, снижением количества раневого отделяемого, уменьшением перифокального воспаления и отёка. Другие авторы описывают развитие нарушений циркуляторного и метаболического характера с формированием локальной ишемии и замедлением заживления при сохранении нормоксии окружающей среды [4–6].

Основным источником электронов для дыхательной цепи митохондрий в норме является окисление НАД-зависимых субстратов. Митохондриальный ферментный комплекс (МФК) I или НАДН-дегидрогеназа занимает лидирующее положение, её вклад по потреблению кислорода составляет 55–65%. При этом МФК II (сукцинатдегидрогеназа) менее активна. В условиях нормоксии всего 25–30% митохондриального дыхания связано с окислением сукцината, который является продуктом пятой и субстратом шестой реакции в цикле Кребса и важнейшим маркером гипоксии в клетке (рис. 1).

При недостатке кислорода, гипоксии средней тяжести (10,5% O<sub>2</sub> относительно атмосферного) наблюдается снижение активности МФК I и, одновременно с этим, повышение экспрессии МФК II, что приводит к ингибированию НАД-за-

висимого окисления и активации сукцинатоксидазного окисления (65–85% митохондриального дыхания). При этом электрон-транспортная функция дыхательной цепи митохондрии сохраняет нормальную активность, хотя интенсивность работы АТФ-азы несколько снижается, что может быть связано с уменьшением поступающего к ней потока протонов в условиях окисления сукцината. Данное состояние является компенсаторным и не вызывает нарушений в работе митохондрии, а также сохраняется достаточная энергетическая обеспеченность клетки (рис. 2) [11].

В условиях тяжёлой гипоксии (8% O<sub>2</sub> относительно атмосферного) нарушается транспорт электронов по дыхательной цепи внутренней мембраны митохондрий из-за чего электроны начинают накапливаться в пулах переносчиков НАДН-ДГТ и CoQ (убихинон). В результате новым акцептором электронов вместо кислорода становится II дыхательный комплекс — сукцинатдегидрогеназа, начинающая работать в обратную сторону превращая фумарат в сукцинат (рис. 3) [11].

Кроме того, в условиях гипоксии образование сукцината может происходить и неферментативным образом. Накопление α-кетоглутарата в сочетании с инактивацией α-кетоглутаратдегидрогеназы, одного из ферментов цикла Кребса, способствует неферментативному декарбоксилированию α-кетоглутарата с образованием сукцината. Накопление пула янтарной кислоты происходит ещё и за счёт активации цикла пуриновых нуклеотидов и малат-аспартатного шунта с образованием фумарата [12].

При тяжёлой гипоксии появляются признаки повреждения ультраструктуры митохондрий, свидетельствующие о функциональном перенапряжении дыхательной цепи. Однако активность АТФ-азы не только не снижается в этот период, но ещё и возрастает, что позволяет

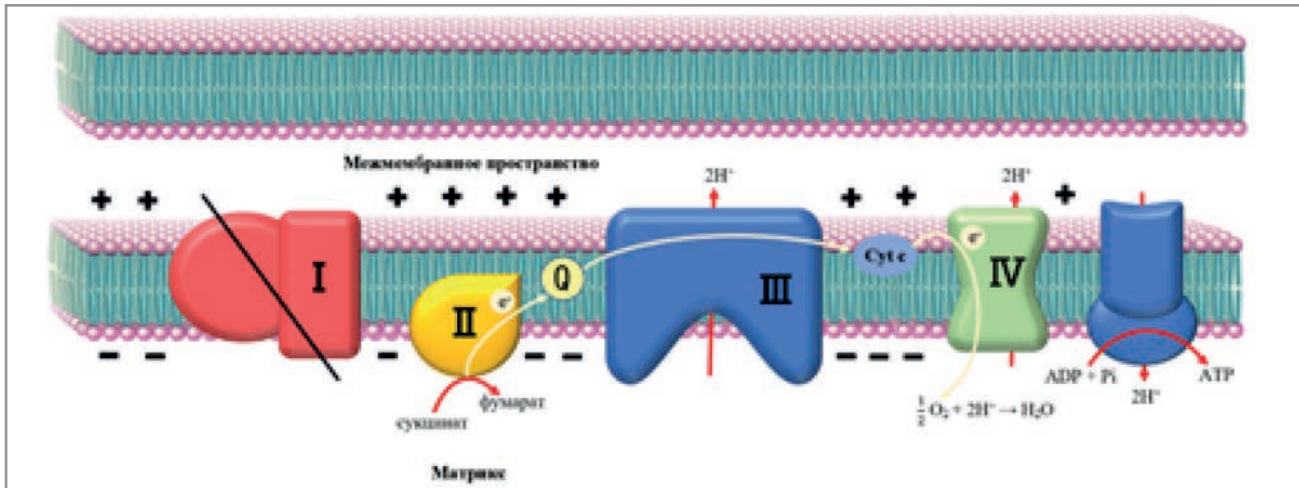


Рис. 2. Схема гипоксии средней степени тяжести.  
Fig. 2. Scheme of hypoxia of moderate severity.

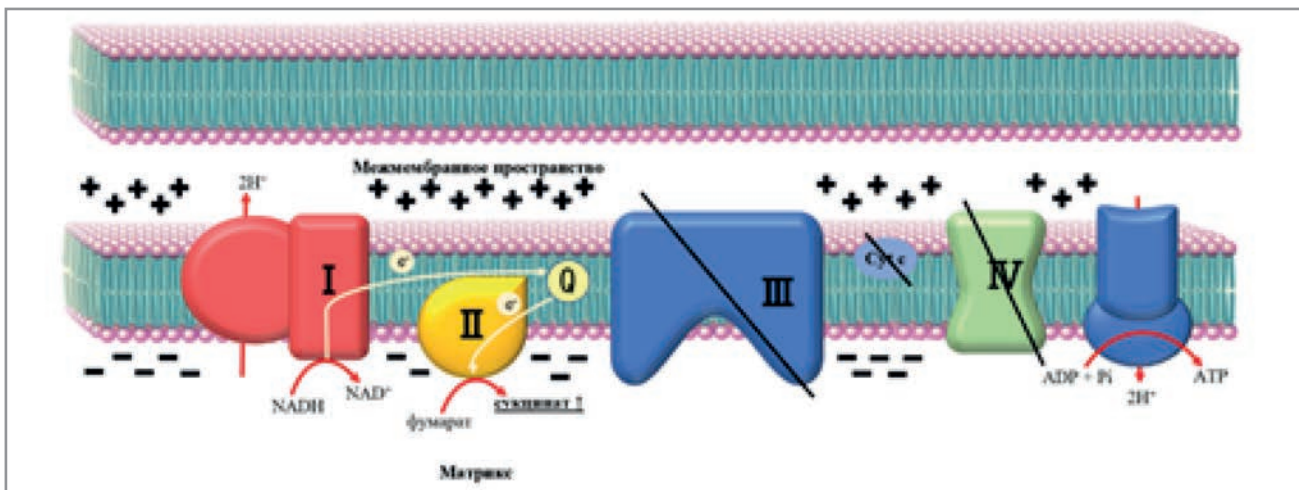


Рис. 3. Схема гипоксии тяжёлой степени.  
Fig. 3. Scheme of severe hypoxia.

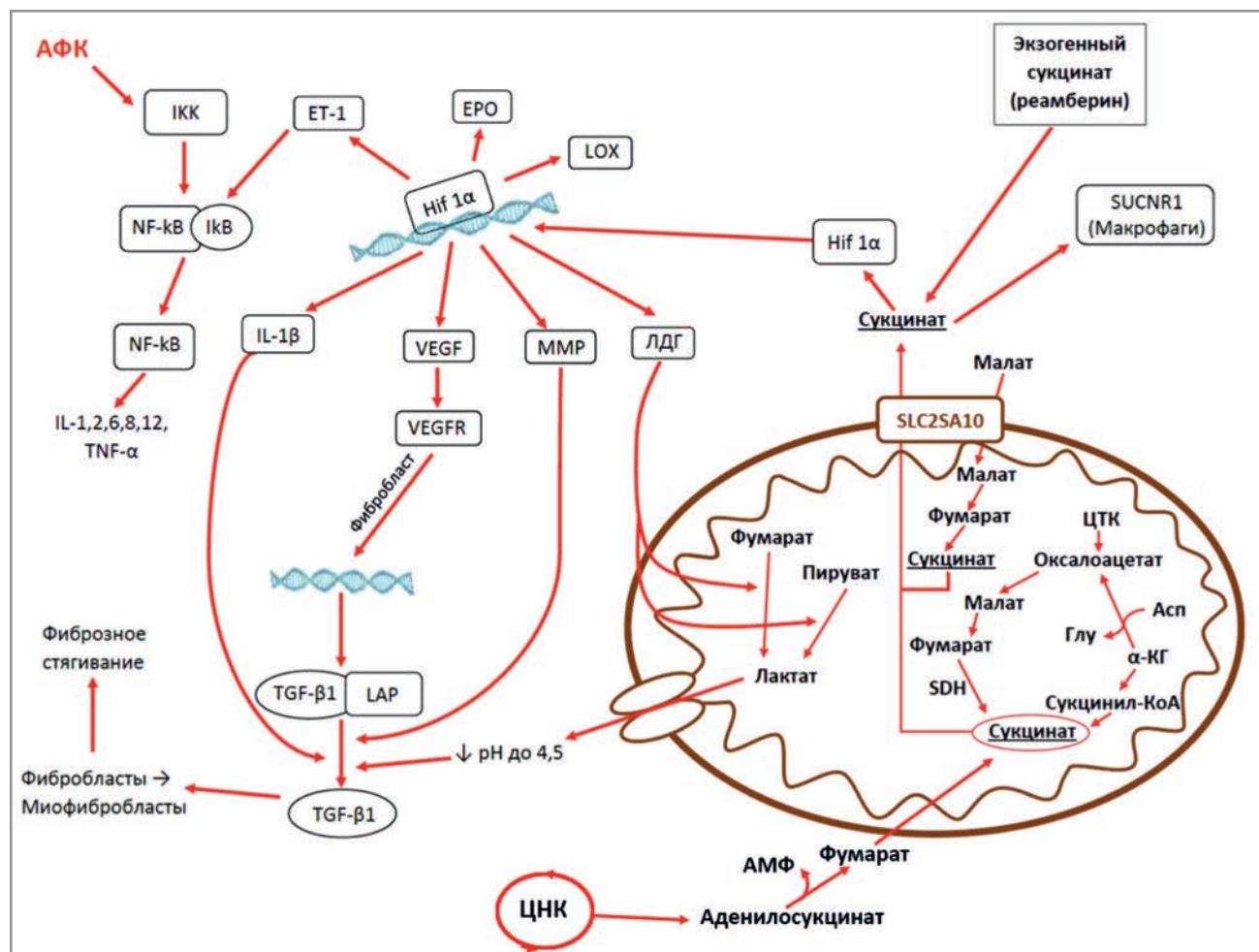
сохранять энергетическую функцию ещё некоторое время — пока не наступит некомпенсированная дисфункция. МФК I при гипоксии сопровождается снижением мембранного потенциала, потерей АТФ и как следствие, наступление гипоэргоза. В результате сукцинат накапливается в матриксе митохондрии и через митохондриальный декарбоксильный носитель SLC25A10 антипортом транспортируется в цитозоль клетки взамен на малат, напротив поступающий в матрикс митохондрии, где он превратится сперва в фумарат а затем по тому же самому механизму станет янтарной кислотой (рис. 4) [13].

Оказавшись вне митохондрии, сукцинат стимулирует синтез индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 $\alpha$  который в свою очередь в условиях дефицита кислорода не подвергается протеасомой деградации, а наоборот, накапливается в цитозоле. Достигнув достаточной концентрации HIF-1 $\alpha$ , начинает действовать на

экспрессию генов в ядре (рис. 5) [12]. Начинается синтез провоспалительных цитокинов. Непрямую IL-1 $\beta$  [13] или опосредованно, через сигнальную цепочку ET-1  $\rightarrow$  NF- $\kappa$ B стимулирующую выработку таких провоспалительных цитокинов как: IL-1,2,6,8,12, TNF- $\alpha$  [14].

Примечательно, что и сам сукцинат напрямую может вызывать воспалительную реакцию путём связывания с рецептором SUCNR1 макрофагов и пучковых клеток, заставляя их мигрировать к месту наибольшей его концентрации, так как янтарная кислота выделяется не только ишемизированной тканью, но ещё и иммунными клетками. В норме, когда макрофаг встречает антиген, начинается так называемый «кислородный взрыв». В иммунной клетке происходит резкое изменение метаболизма, она усиленно поглощает кислород из окружающей среды, который не идёт на окислительное фосфорилирование в митохондриях, а тратится на образование АФК, обладающих сильным антимикроб-



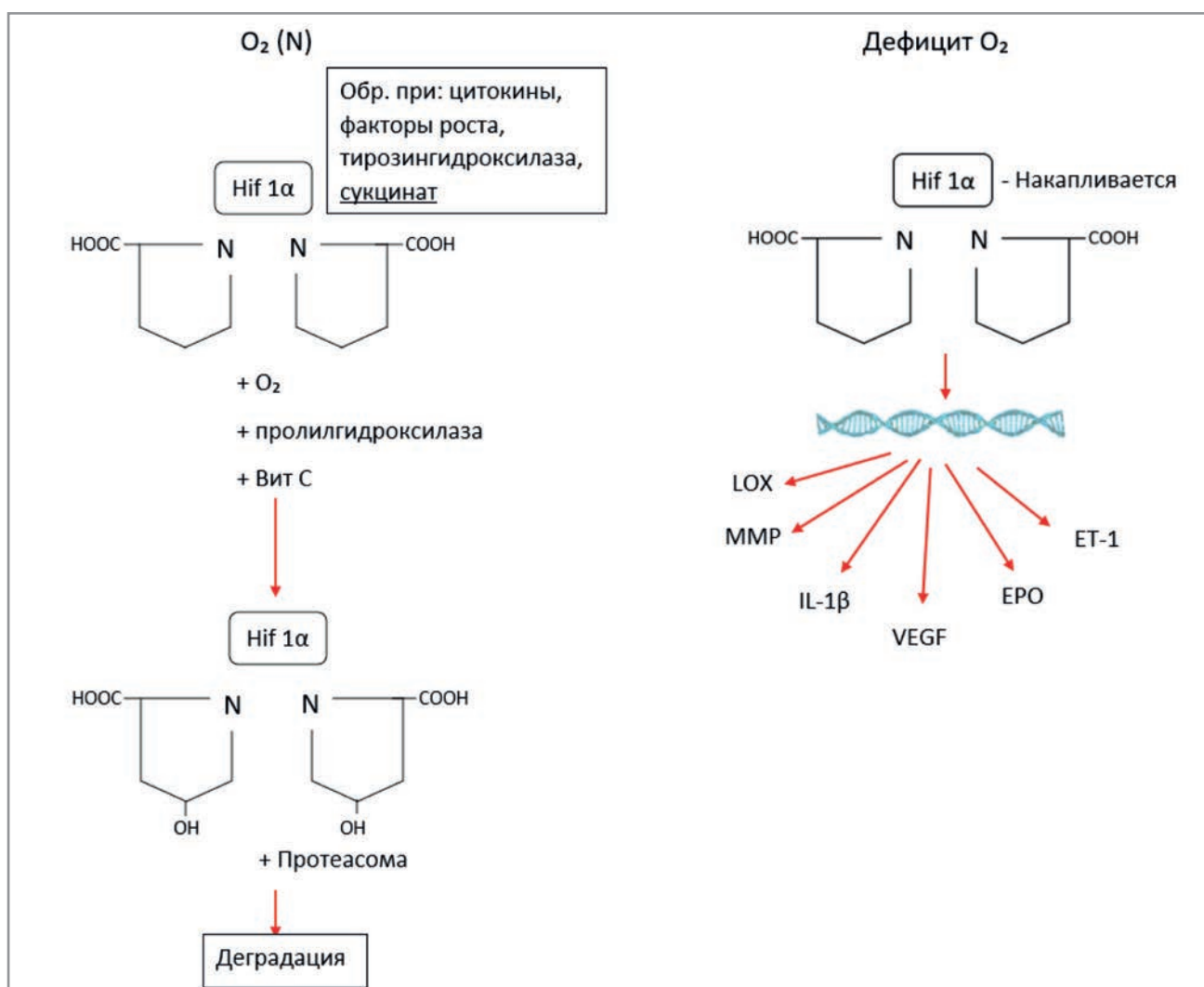


**Рис. 4.** Схема метаболизма сукцината внутри клетки.  
**Fig. 4.** The scheme of succinate metabolism inside the cell.

ным действием. Генерировать АТФ макрофаг будет путём анаэробного гликолиза, в то же время подавляя окислительное фосфорилирование. Это метаболическое переключение приводит к повышению уровня сукцината ещё больше привлекая иммунные клетки к месту гипоксии [14, 15]. Кроме того, HIF-1α экспрессирует синтез лактатдегидрогеназы, усиливая анаэробный гликолиз и предотвращая тем самым развитие в клетке гипогероза, вызванного снижением активности окислительного фосфорилирования в условиях гипоксии [16]. Так же под действием HIF-1α запускается продукция и выделение из клетки таких биологически активных факторов, как Epo (фактор эритропоэза) [17], VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) [18], ET-1 (эндотелин) [19], LOX (лизилоксидаза) [20], MMP (матриксные металлопротеиназы) [21], что способствует репарации повреждённой ткани и стимулирует неоангиогенез.

Эритропоэтин (Epo) — многофункциональный цитокин, синтезируемый перитубулярными интерстициальными фибробластами коры и тубулярными клетками почек. Он обладает стимулирующим эффектом на пролиферацию эритроидных клеток, их созревание, скорость синтеза глобина, порфиринов, а также на утилизацию железа, скорость выхода ретикулоцитов из костного мозга в кровь и превращение их в зрелые эритроциты.

Наиболее выраженное действие Epo оказывает на самые ранние клетки — предшественники эритроидного ряда (бурстобразующая и колониеобразующая эритроидные единицы), менее выраженное и постепенно уменьшающееся действие — на потомков их созревания и дифференцировки — морфологически идентифицируемые молодые эритроидные элементы (проэритробласты и нормобласты). На зрелые эритроциты он не действует из-за отсутствия у них соответствующих рецепторов. Другой важной особенностью Epo является способность предотвращать апоптоз эритроидных клеток предшественников на поздних стадиях развития за счёт подавления их фагоцитоза макрофагами. Кроме того, он может влиять на дифференцировку и пролиферацию Т-лимфоцитов, помимо иммунных клеток рецепторами к нему обладают ещё и гладкомышечные клетки сосудов,



**Рис. 5. Реализуемые эффекты Hif 1α при нормоксии и гипоксии.**  
**Fig. 5. Realizable effects of Hif 1α in normoxia and hypoxia.**

моноциты, эпителиоциты. Таким образом эритропоэтин обладает плейотропным цитопротективным, антигипоксическим и иммунопротективным действием [17].

VEGF — семейство сосудистых эндотелиальных факторов роста, стимулирующие неоангиогенез путём связывания с EGFR и индукции выработки эндотелина [15], который преимущественно экспрессируется на эндотелиальных клетках. Они регулируют клеточную пролиферацию, миграцию, выживание и проницаемость сосудов во время васкулогенеза и ангиогенеза [18]. VEGF также могут являться пусковым фактором всего процесса фиброза, так как увеличенная концентрация VEGF стимулирует депонирование коллагена в образующемся рубце. То же подтверждается исследованием H. Park и соавт. [22], которые показали, что VEGF индуцирует образование TGF-β1 и, соответственно, трансформацию клеток-предшественников в миофибробласты.

MMP — семейство цинковых металлопротеиназ, секретируемых фагоцитами, лимфоцитами, фибробластами и эпителиальными клетками. Известно более 30 видов этих белков, в частности к ним относится и коллагеназа. В «зрелых» тканях активность её обычно достаточно низкая. Продукция и экспрессия коллагеназы, как и остальных MMP, возрастают в связи с реорганизацией, воспалением и процессом заживления тканей [21].

LOX — внеклеточный Cu — зависимый фермент, который катализирует в соединительной ткани сборку внеклеточного матрикса путём образования альдегидов из остатков лизина в предшественниках коллагена и эластина. Это необходимо для дифференцировки, адгезии, пролиферации, миграции и коммуникации клеток во время заживления ткани. Помимо внеклеточного матрикса LOX был обнаружен и внутри клеток. Он способен повторно проникать в цитоплазму, ассоциироваться с цитоскелетом и транспортироваться к ядру, где он модифицирует

структуру хроматина, стимулируя клетку синтезировать ещё больше HIF-1 $\alpha$  и VEGF. Таким образом, между LOX, VEGF и HIF-1 $\alpha$  существует взаимная регуляторная активность. Среди других функций была идентифицирована роль каталитически активной LOX на тромбоцитарный фактор роста (PDGF) посредством модификации/окисления остатков лизила рецептора PDGFR- $\beta$  на клеточной поверхности мегакариоцита, что ускоряет его пролиферацию и дифференцировку [20].

ET-1 — мультифункциональный паракринный фактор, синтезируемый в виде профермента (Big-эндотелин) эндотелиальными клетками и активирующийся за счёт эндотелин превращающего фермента на поверхности эндотелия. Эффекты эндотелина зависят от взаимодействующего с ним рецептора. ETA (A-рецепторы) расположены на мембранах гладкомышечных клеток сосудов, и их взаимодействие с ET-1 приводит к сокращению клеток и в итоге к выраженному спазму сосудов. При отсутствии в сосудах гладкомышечных клеток, имеющих доминирующие A рецепторы, происходит связывание лиганда с ETB (B-рецепторы) расположенными на эндотелиоцитах, и их активация, наоборот, стимулирует повышение активности NO-синтазы и как следствие приводит к вазодилатации. Также установлено, что эндотелин-1 индуцирует в разных органах и тканях провоспалительные процессы путём активации транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и стимуляции активации нейтрофилов через усиление экспрессии адгезивных молекул на эндотелиальных клетках сосудов. Помимо воспалительного эффекта эндотелин-1 способен усиливать оксидантную нагрузку, это доказывает тот факт, что при внутривенном введении блокатора A-рецептора эндотелина повышаются антиоксидантные свойства плазмы крови, снижается интенсивность процессов перекисного окисления липидов и уменьшается артериальное давление. Таким образом эндотелин может способствовать увеличению кровотока в зоне повреждения и обеспечивать тем самым энергетические потребности для репарации ткани, а также позволяет подавлять патогенную микрофлору в ране, активируя воспалительные реакции и выработку АФК [19].

Экспрессирующийся под действием индуцируемого гипоксией фактора IL-1 $\beta$ , помимо пролиферации и дифференцировки макрофагов, нейтрофилов, T- и B-лимфоцитов, фибробластов, приводит

также к увеличению выработки поджелудочной железой инсулина, что облегчает транспорт глюкозы к клеткам и ускоряет энергетический обмен, это в свою очередь должно благотворно влиять на процесс заживления ран [15, 16].

Таким образом, главные преимущества сукцината перед другими метаболическими субстратами проявляются в условиях гипоксии, на начальных этапах которой продукция эндогенного сукцината и скорость его окисления возрастает. При декомпенсации эндогенной продукции янтарной кислоты наступает торможение цикла трикарбоновых кислот и активация анаэробного гликолиза. В этот момент и до наступления необратимых биохимических повреждений восстановление процессов энергообмена начинает зависеть от сукцината, в том числе и от экзогенного его поступления. Не менее важным противогипоксическим эффектом экзогенного сукцината является его способность стимулировать сукцинатоксидазное окисление янтарной кислоты с восстановлением её потребления в дыхательной цепи митохондрий и возрастанием активности антиоксидантной функции глутатиона, а также стимуляцию белкового метаболизма. Совокупность этих эффектов определяет ведущую роль сукцината среди всех субстратных антигипоксантов. Включение реамберина (меллюмина натрия сукцината) в инфузионную терапию пациентов с ранами различной этиологии способствует восстановлению тканей при гипоксии за счёт своих антигипоксантного, цитопротекторного и других эффектов, обусловленных активацией HIF-1 $\alpha$  биологически активных факторов, что клинически проявляется в более быстром купировании симптомов интоксикации и ускорении регенеративных процессов в ране.

## Заключение

Таким образом, сочетанное применение у пациентов с ранами различной этиологии NPWT-терапии местно и внутривенных инфузий меллюмина натрия сукцината является патогенетически обоснованным: первая позволяет управлять локальной гипоксией ткани под вакуумной повязкой, способствуя регенеративным процессам, а применение реамберина, за счёт его полифункциональности, способствует улучшению общего состояния пациента.

## Литература/References

1. Бесчастнов В.В., Измайлов С.Г., Багрянцев М.В., Орлинская Н.Ю., Лукоянычев Е.Е., Миронов А.А. Активность процессов репаративной регенерации в условиях локальной циркуляторной гипоксии окололаневого области. *Новости хирургии*. 2015; 23 (6): 612–618. doi: <https://doi.org/10.18484/2305-0047.2015.6.612>. [Beschastnov V.V., Izmajlov S.G., Bagryantsev M.V., Orlinkaya N.YU., Lukoyanychev E.E., Mironov A.A. The activity of the processes of reparative regeneration in the conditions of local circulatory hypoxia of the near-cranial region *Novosti*
2. Оболеский В. Н., Ермолов А.А., Аронов Л.С., Родоман Г.В., Серов Р.А. Применение метода локального отрицательного давления в комплексном лечении острых гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей. *Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова*. 2012; 1: 50–55. [Obolenskij V. N., Ermolov A.A., Aronov L.S., Rodoman G.V., Serov R.A. Application of the method of local negative pressure in the complex treatment of acute purulent-inflammatory diseases of soft tissues. *Hirurgija. Zhurnal im. N. I. Pirogova*. 2012; 1: 50–55]

3. Часнойт А. Ч., Жилинский Е. В., Серебряков А. Е., Лещенко В. Т. Механизмы действия вакуумной терапии ран Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. 2015; 4: 25–35 [Chasnoj't A. Ch., Zhilinskij E. V., Serebrjakov A. E., Leshhenko V. T. Mechanisms of action of vacuum therapy of wounds Mezhdunarodnye Obzory: Klinicheskaja Praktika i Zdorov'e. 2015; 4: 25–35. (in Russian)]
4. Morykwas M.J., Argenta L.C., Shelton-Brown E.L., VcGuirt W. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control end treatment animal studies an basic foundation. *Ann Plast Surg.* 1997; 38 (6): 553–562.
5. Песчанский В. С., Шнейдер А. Б., Бондаренко В. Д. Математическое моделирование скорости заживления кожных ран в эксперименте. Механические повреждения мягких тканей. Под ред. С. Д. Попова. Вып. 76. Горький: 1976; 100–103. [Peschanskij V.S., SHnejder A.B., Bondarenko V.D. Mathematical modeling of the healing speed of skin wounds in the experiment. Mechanical damage to soft tissues. Ed. S. D. Popova. Vyp. 76. Gor'kij: 1976; 100–103. (in Russian)]
6. Левченко О. С., Новиков В. Е. Индукторы регуляторного фактора адаптации к гипоксии. Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2014; 2: 135–145. [Levchenko O.S., Novikov V.E. Inductors of the regulatory factor for adaptation to hypoxia. Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I. P. Pavlova. 2014; 2: 135–145. (in Russian)]
7. Варганов М. В., Микличев А. А., Богданов К. Д. Особенности предоперационной подготовки пациентов с ожогами и хроническими язвами различной этиологии к аутодермопластике. Антибиотики и химиотерапия. 2020; 65 (11–12): 22–26. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-11-12-22-26>. [Varganov M. V., Miklichev A.A., Bogdanov K.D. Osobennosti predoperatsionnoj podgotovki patsientov s ozhogami i khronicheskimi yzvamami razlichnoj etiologii k autodermoplastike. Antibiotiki i Khimioter. 2020; 65 (11–12): 22–26. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-11-12-22-26>. (in Russian)]
8. Микличев А. А., Варганов М. В., Кузяев М. В., Шапиурина А. А. Сочетанное применение NPWT-терапии и инфузии реамберина в лечении трофической язвы нижней конечности (клиническое наблюдение) Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова 2019; 1: 99–102 <https://doi.org/10.17116/hirurgia20191199>. [Miklichev A.A., Varganov M.V., Kuzyaev M.V., Shamshurina A.A. Sochetannoe primenenie NPWT-terapii i infuzii reamberina v lechenii troficheskoj yazyv nizhnej konechnosti (klinicheskoe nabljudenie) Khirurgiya. Zhurnal im. N. I. Pirogova 2019; 1: 99–102 <https://doi.org/10.17116/hirurgia20191199>. (in Russian)]
9. Мазина Н. К., Шецунов И. В., Мазин П. В. Адьювантная энергопротекция реамберином в практике интенсивной терапии и реанимации: эффективность по данным метаанализа (систематический обзор). Анестезиология и реаниматология. 2016; 61 (4): 314–319. doi: <https://doi.org/10.18821/0201-7563-2016-4-314-319>. [Mazina N.K., Sheshunov I.V., Mazin P.V. Ad'jyuvantnaya energoproteksiya reamberinom v praktike intensivnoj terapii i reanimatsii: effektivnost' po dannym metaanaliza (sistematicheskij obzor). Anesteziologiya i Reanimatologiya. 2016; 61 (4): 314–319. doi: <https://doi.org/10.18821/0201-7563-2016-4-314-319>. (in Russian)]
10. Галимов О. В., Туйсин С. Р., Закиев Т. З., Закиева И. В., Садыкова А. Ф., Богданов И. В., Пономарев В. Н. Биохимические механизмы заживления ран. Башкирский химический журнал. 2008; 15 (3): 82–83. [Galimov O. V., Tujsin S. R., Zakiev T. Z., Zakieva I. V., Sadykova A. F., Bogdanov I. V., Ponomarev V. N. Biokhimicheskie mekhanizmy zashivleniya ran. Bashkirkij Khimicheskij Zhurnal. 2008; 15 (3): 82–83. (in Russian)]
11. Лукьянова Л. Д. Сигнальные механизмы гипоксии. М.: РАН, 2019; 215. [Luk'yanova L.D. Signal'nye mekhanizmy gipoksii. Moscow: RAN, 2019; 215. (in Russian)]
12. Chouchani E.D., Pell V.R., Gaude E., Aksentijevic D., Sundier S.Y., Robb E.L., Logan A., Nadtochiy S.M., Ord E.N.J., Smith A.C., Eyassu F., Shirley R., Hu C.H., Dare A.J., James A.M., Rogatti S., Hartley R.S., Eaton S., Costa A.S.H., Brookes P.S., Davidson S.M., Duchon M.R., Saeb-Parsy K., Shattock M.J., Robinson A.J., Work L.M., Frezza C., Krieg T., Murphy M.R. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014 Nov 20; 515 (7527): 431–435. doi: [10.1038/nature13909](https://doi.org/10.1038/nature13909).
13. Murphy M.P., O'Neill L.A.J. Krebs Cycle Reimagined: The Emerging roles of succinate and itaconate as signal transducers cell. 2018 Aug 9; 174 (4): 780–784. doi: [10.1016/j.cell.2018.07.030](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.030).
14. Yang C., Zhong Z.F., Wang C.P., Vong C.T., Yu B., Wang Y.T. HIF-1: structure, biology and natural modulators. *Chin J Nat Med.* 2021 Jul; 19 (7): 521–527. doi: [10.1016/S1875-5364\(21\)60051-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(21)60051-1).
15. Шурьгин М. Г., Шурьгина И. А., Каня О. В., Дремина Н. Н., Лушников Е. Л., Непомнящих Л. М. Значение повышения продукции эндотелина при инфаркте миокарда Фундаментальные исследования. 2015; 1: 1281–1287. [Shurygin M.G., Shurygina I.A., Kanya O.V., Dremina N.N., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh L.M. Znachenie povysheniya produktsii endotelina pri infarkte miokarda Fundamental'nye Issledovaniya. 2015; 1: 1281–1287. (in Russian)]
16. Feng Y., Xiong Y., Qiao T., Li X., Jia L., Han Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy *Cancer Med.* 2018 Dec; 7 (12): 6124–6136. Published online 2018 Nov 6. doi: [10.1002/cam4.1820](https://doi.org/10.1002/cam4.1820).
17. Варламова О. Н., Червяковская О. Д. Эритропоэтин и его биологическая роль. Медицина: теория и практика. 2019; 4 (3): 61–69. [Varlamova O.N., Chervyakovskaya O.D. Eritropoetin i ego biologicheskaya rol'. Meditsina: Teoriya i Praktika. 2019; 4 (3): 61–69. (in Russian)]
18. Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development cell. 2019 Mar 7; 176 (6): 1248–1264. doi: [10.1016/j.cell.2019.01.021](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021).
19. Чеснокова Н. Б., Павленко Т. А., Безнос О. В., Григорьев А. В. Роль эндотелиновой системы в патогенезе глазных болезней. Вестник офтальмологии. 2020; 1: 117–123. doi: [10.17116/oftalma2020136011117](https://doi.org/10.17116/oftalma2020136011117). [Chesnokova N.B., Pavlenko T.A., Beznos O.V., Grigor'ev A.V. Rol' endotelinovyj sistemy v patogeneze glaznykh boleznej. Vestnik Oftal'mologii. 2020; 1: 117–123. doi: [10.17116/oftalma2020136011117](https://doi.org/10.17116/oftalma2020136011117). (in Russian)]
20. Laczko R., Csiszar K. Lysyl oxidase (LOX): functional contributions to signaling pathways biomolecules. 2020 Jul 22; 10 (8): 1093. doi: [10.3390/biom10081093](https://doi.org/10.3390/biom10081093).
21. Тихаева К. Ю., Рогова Л. Н., Ткаченко Л. В. Роль металлопротеиназ в обмене белков внеклеточного матрикса эндометрия в норме и при патологии. Проблемы репродукции. 2020; 26 (4): 22–29. doi: [10.17116/repro20202604122](https://doi.org/10.17116/repro20202604122). [Tikhaeva K.Ju., Rogova L.N., Tkachenko L.V. Rol' metalloproteinaz v obmene belkov vnekletochnoho matriksa endometriya v norme i pri patologii. Problemy Reproduktsii. 2020; 26 (4): 22–29. doi: [10.17116/repro20202604122](https://doi.org/10.17116/repro20202604122). (in Russian)]
22. Park H.Y., Kim J.H., Park C.K. VEGF induces TGF-beta1 expression and myofibroblast transformation after glaucoma surgery. *Am J Pathol* 2013; 182 (6): 2147–2154. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.009>

## Информация об авторах

Варганов Михаил Владимирович — д. м. н., профессор кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, Ижевск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-8858-3890

Микличев Алексей Александрович — аспирант кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России; заведующий ожоговым отделением БУЗ УР «1 РКБ МЗ УР»; врач-хирург, Ижевск, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8326-3567

Свидерский Илья Викторович — студент 4 курса ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России, Ижевск, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9175-2475

## About the authors

Mikhail V. Varganov — D. Sc. in Medicine, Professor of the Department of faculty surgery, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of Russian Federation, Izhevsk, Russia. ORCID ID: 0000-0002-8858-3890

Alexey A. Miklichev — Postgraduate student of the Department of faculty surgery of the Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of Russian Federation; Head of the burn department, 1 Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Udmurt Republic; surgeon, Izhevsk, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8326-3567

Ilya V. Svidersky — 4<sup>th</sup> year student, Izhevsk State Medical Academy of the Ministry of Health of Russian Federation, Izhevsk, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9175-2475

# Бактериальный (септический) артрит<sup>1</sup>

\*Б. С. БЕЛОВ, Н. В. МУРАВЬЕВА

ФГБНУ НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, Москва, Россия

## Bacterial (Septic) Arthritis

\*BORIS S. BELOV, NATALIA V. MURAVYEVA

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

### Резюме

В современных условиях проблема бактериального артрита (БА) является весьма актуальной. Ведущий этиологический агент БА — *Staphylococcus aureus*. Частота летальных исходов при БА существенно не изменилась за последние 25 лет и составляет 5–15%. В статье освещены современные данные об этиологии, патогенезе, клинической картине, диагностике БА. Изложены показания к открытому хирургическому дренированию инфицированного сустава. Представлены основные схемы эмпирической и этиотропной антибактериальной терапии БА.

**Ключевые слова:** бактериальный артрит; диссеминированная гонококковая инфекция; антибактериальная терапия; прогноз

**Для цитирования:** Белов Б. С., Муравьева Н. В. Бактериальный (септический) артрит. Антибиотики и химиотер. 2023; 68: 3–4: 84–91. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-84-91>.

### Abstract

In modern conditions, the problem of bacterial arthritis (BA) is very relevant. The leading etiological agent of BA is *Staphylococcus aureus*. The frequency of deaths in BA has not changed significantly over the past 25 years and is 5–15%. The article highlights current data on the etiology, pathogenesis, clinical picture, diagnosis of BA. Indications for open surgical drainage of an infected joint are presented. The main schemes of empirical and etiotropic antibacterial therapy of BA are presented.

**Keywords:** bacterial arthritis, disseminated gonococcal infection, antibacterial therapy, prognosis.

**For citation:** Belov B. S., Muravyeva N. V. Bacterial (septic) arthritis. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 84–91. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-84-91>.

Бактериальный артрит (БА) — быстро прогрессирующее, нередко деструктивное поражение суставов, обусловленное непосредственной инвазией синовиальной оболочки гноеродными микроорганизмами.

### Эпидемиология

Ежегодная частота БА составляет в целом 4–10 случаев на 100 000 населения, 5,5–12/100 000 — среди детей и 28–70 на 100 000 — среди больных ревматоидным артритом (РА). БА диагностируют у 8–27% больных, обратившихся к врачу с жалобой на острую боль в суставе [1–4]. Чаще поражаются дети и лица старших возрастных групп. Половой диморфизм четко не прослеживается.

БА может быть вызван любой известной бактерией (табл. 1). Ведущий этиологический агент БА — *Staphylococcus aureus*, который наиболее часто (80%) выделяют при инфекциях суставов у больных РА и сахарным диабетом. Данный возбудитель также является причиной 70–80% случаев инфекционного коксита и полиарткулярных вариантов БА. В последние годы наблюдается явное нарастание штаммов *S. aureus*, устойчивых к метициллину (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* — MRSA). MRSA как этиологический агент БА чаще встречается у лиц, недавно выписавшихся из стационара, жителей домов престарелых, наркоманов, употребляющих внутривенные наркотики, у пациентов с кожными язвами и длительно стоящими катетерами центральных вен и т. д.

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: Каширское шоссе, 34А, НИИ ревматологии им. В. А. Насоновой, г. Москва, Россия, 115522. E-mail: [belovbor@yandex.ru](mailto:belovbor@yandex.ru)

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 34-A Kashirskoe highway, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, 115522 Russian Federation. E-mail: [belovbor@yandex.ru](mailto:belovbor@yandex.ru)

<sup>1</sup> Проблема инфекции протезированного сустава в настоящей статье не рассматривается.

Как показано в эксперименте, *S.aureus* обладает специфическими поверхностными белками (адгезинами, фибронектин-связывающими протеинами), которые расцениваются как ведущие факторы вирулентности, способствующие процессу адгезии (прилипания) возбудителя к костной и хрящевой тканям [5].

На втором месте по частоте выделения у больных БА находятся стрептококки, которые большей частью ассоциируются с фоновыми аутоиммунными заболеваниями, хронической инфекцией кожи и предшествующей травмой. Пневмококк в качестве возбудителя БА фигурирует в основном у больных хроническим алкоголизмом и/или циррозом печени, но в целом его встречаемость в последние годы существенно снизилась. Стрептококки других групп (В, G, С и F — в порядке убывания) выделяются при БА у больных с иммунной недостаточностью, злокачественными новообразованиями, а также инфекционной патологией пищеварительного и урогенитального тракта.

Грамотрицательные палочки как причина БА выявляются у больных с иммунодефицитом, наркоманов, вводящих наркотики внутривенно, а также пожилых пациентов. БА, вызванный *N.gonorrhoeae*, встречается, как правило, в рамках диссеминированной гонококковой инфекции (ДГИ). Анаэробы в качестве возбудителей БА чаще фигурируют у больных сахарным диабетом и глубокими инфекциями мягких тканей.

Причиной БА, развивающегося после укуса собаки или кошки, являются *Pasteurella multocida* и *Capnocytophaga* spp., в случае укуса человека — *Eikenella corrodens* и *Fusobacterium nucleatum*. У лиц с полиартикулярным БА, возникающим после укуса крысы, из крови и СЖ иногда выделяют *Streptobacillus moniliformis*.

## Патогенез

В нормальных условиях суставные ткани стерильны. В качестве наиболее значимых факторов риска БА рассматривают ослабление противомикробного иммунитета макроорганизма (пожилой возраст, тяжёлые сопутствующие заболевания — сахарный диабет, цирроз печени, хроническая почечная недостаточность, онкологические болезни и др.) и первичные очаги инфекции (пневмония, пиелонефрит, пиодермия и др.). Также существенную роль играет уже имеющееся заболевание суставов (РА, подагрический артрит, гемартроз, остеоартрит) и проводимая по этому поводу терапия, а также возможные осложнения последней [6–8]. В частности, назначение глюкокортикоидов — ГК (в т. ч. внутрисуставно), цитотоксических иммунодепрессантов, а также ингибиторов фактора некроза опухоли-а (иФНО-а) значимо повышает вероятность развития БА у больных

**Таблица 1. Микробы — возбудители БА [сводные данные]**

<b>Table 1. Microbes — pathogens of BA [consolidate data]</b>	
<b>Микроорганизмы</b>	<b>Частота, %</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	37–65
<i>Streptococcus</i> spp.	10–28
<i>S.pneumoniae</i>	1–10
<i>S.pyogenes</i> (A)	8–12
Прочие	4–10
Грамотрицательные бактерии	10–16
<i>Haemophilus influenzae</i>	4–7
<i>Escherichia coli</i>	6–9
<i>Pseudomonas</i> spp.	2,5–4
Прочие	1–4
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,6–12
Анаэробы	1,4–3
Грибы	1,3–2
2 патогена и более	3–10
Не выделено	10–20

РА. По данным крупного наблюдательного проспективного исследования, применение иФНО-а у больных РА повышало риск развития БА в 2,3 раза [9]. Вероятность инфицирования макроорганизма повышается при выполнении различных манипуляций, включая внутривенные введения препаратов (в т. ч. наркотиков), длительно стоящие катетеры центральных вен, разнообразных инвазивных медицинских вмешательствах. Показано, что повреждение тканей в результате бытовой или производственной травмы, укусов животных или человека наряду с медицинскими манипуляциями является причиной БА кистей в 85–90% случаев [10]. Определённое значение в развитии БА могут иметь врождённые расстройства фагоцитоза, выражающиеся в недостаточности комплемента и нарушении хемотаксиса.

К основным факторам риска ДГИ для женщин относят менструацию, беременность, послеродовой период, хроническую бессимптомную эндцервикальную инфекцию; для мужчин — гомосексуализм; для лиц обоего пола — экстрагенитальную гонококковую инфекцию (ГИ), беспорядочные половые связи, низкий социально-экономический и образовательный статус, системную красную волчанку (СКВ), употребление наркотиков внутривенно, ВИЧ-инфекцию, врождённый дефицит C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub>-компонентов комплемента [11, 12]. Возможность инфекционного поражения сустава увеличивается при существовании нескольких факторов.

Инфицирование сустава является следствием гематогенной диссеминации при транзитной или стойкой бактериемии, лимфогенного распространения из ближайших к суставу очагов инфекции, а также прямого попадания возбудителей при медицинских манипуляциях (артроцентез, артроскопия) и проникающих травмах, вызванных контаминированными предметами.

В результате инвазии бактерий в синовиальную оболочку формируется активный воспалительный клеточный ответ и выход клеток, участвующих в воспалении, в полость сустава. Под влиянием продуктов жизнедеятельности бактерий происходит стимуляция иммунного ответа и высвобождение разнообразных медиаторов воспаления. Накопление провоспалительных цитокинов и продуктов аутолиза фагоцитов — протеаз приводит к торможению синтеза хряща и его деградации с последующей деструкцией хрящевой и костной ткани и формированием костного анкилоза.

Назначение ранней адекватной антибактериальной терапии, как правило, приводит к полному выздоровлению. Однако возможно развитие хронического персистирующего «стерильного» синовита, являющегося иммуновоспалительной реакцией на антигены фрагментов бактерий или пораженного хряща.

## Клиническая картина

В типичных случаях БА начинается остро с выраженных болей, припухлости, гиперемии кожи и гипертермии поражённого сустава, сопровождающихся лихорадочным синдромом (60–80% случаев) и потрясающим ознобом (25%). Однако температура тела может быть субфебрильной и даже нормальной у больных пожилого возраста, на фоне активной противовоспалительной терапии по поводу основного заболевания, при поражении тазобедренных и крестцово-подвздошных суставов (при этом нарастающая интенсивная артралгия является единственным симптомом заболевания). В 80–90% случаев поражается один сустав (чаще — коленный или тазобедренный). У 10–15% больных может иметь место олиго- или полиартикулярный тип поражения, особенно при развитии БА на фоне РА, системных болезней соединительной ткани и у наркоманов, вводящих наркотики внутривенно. Кроме того, для БА у «внутривенных» наркоманов характерно более медленное начало, длительное течение и частые поражения синдесмозов туловища (крестцово-подвздошные и грудино-ключичные сочленения, лонное сращение).

При развитии БА в рамках ДГИ наряду с общим недомоганием и лихорадкой выявляют кожные высыпания и теносиновит. У 66–75% больных ДГИ развивается гонорейный дерматит, который характеризуется немногочисленными геморрагическими папулезными или пустулезными высыпаниями, большей частью безболезненными, диаметром от 1 до 3 мм с локализацией на дистальных участках конечностей. Возможно формирование пузырей с геморрагическим содержимым, однако в типичных случаях образуется папулопустула, имеющая геморрагический или

некротический центр с округлым фиолетовым ореолом. Как правило, сыпь претерпевает обратное развитие в течение 4–5 дней и оставляет после себя нестойкую пигментацию. В 2/3 случаев ДГИ развивается асимметричный теносиновит с преимущественным поражением сухожильных влагалищ кистей и стоп, который протекает параллельно с кожными изменениями. В рамках ДГИ также наблюдаются гепатит, миоперикардит, крайне редко — эндокардит, менингит, перигепатит (синдром Фитц-Хью-Куртиса), респираторный дистресс-синдром у взрослых и остеомиелит.

## Диагностика

При анализе периферической крови у больных БА в большинстве случаев выявляют лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево и значительное повышение СОЭ. Примечательно, что при развитии БА у больных РА, получающих системную терапию ГК, число лейкоцитов может быть нормальным примерно в половине случаев. При отсутствии фоновых воспалительных заболеваний большое диагностическое значение придаётся повышенным уровням С-реактивного белка (С-РБ).

Основу диагностики БА составляет развернутый анализ синовиальной жидкости — СЖ (включая микробиологическое исследование), полученной с помощью пункционной аспирации из поражённого сустава. Визуально СЖ при БА имеет гнойный характер, серовато-желтого или кровянистого цвета, интенсивно мутная, густая, с большим аморфным осадком. При подсчёте лейкоцитов уровень цитоза (с преобладанием нейтрофилов >85%) часто превышает таковой при других воспалительных заболеваниях (РА, подагрический артрит, реактивные артриты). Показано, что если число лейкоцитов в СЖ составляет >25000/мм<sup>3</sup>, >50000/мм<sup>3</sup> и >100000/мм<sup>3</sup>, то вероятность наличия БА возрастает в 2,9, 7,7 и 28 раз, соответственно [13]. В СЖ также отмечается низкое содержание глюкозы, составляющее менее половины от её сывороточной концентрации, и высокий уровень молочной кислоты.

Посев СЖ выполняют сразу же после её взятия на среды для аэробных и анаэробных возбудителей. При этом оптимизация микробиологических методик крайне важна, поскольку посев СЖ на твёрдых средах даёт отрицательный результат в 20% случаев. Причинами БА, при котором возбудитель не выявляется из крови или СЖ с помощью обычных методов культивирования, могут быть *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Borrelia burgdorferi* и *Tropheryma whippelii*. Кроме того, показано, что применение антибиотиков в течение предыдущих 3 мес. значительно снижает частоту положительных результатов культурального исследова-

дования (ОР 2,67; 95% ДИ 1,02–6,95) [14]. Помимо этого, возможно получение ложноположительных результатов посевов СЖ вследствие контаминации, что чаще встречается при пункции плечевых и/или лучезапястных суставов. В пользу ложноположительных микробиологических данных могут свидетельствовать низкое количество лейкоцитов в СЖ, выделение коагулазонегативного стафилококка или *Bacillus* spp. и время до получения роста микробов в культуре >48 ч [15].

С целью получения предварительных данных о возбудителе и решения вопроса о назначении эмпирической антибактериальной терапии целесообразно окрашивание мазков по Граму, желательное с предварительным центрифугированием СЖ, что позволяет повысить диагностическую эффективность метода. По данным описательного обзора, суммарные показатели чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностической значимости окрашивания мазков по Граму при сопоставлении с результатами культурального исследования составили 37, 99, 99 и 28%, соответственно [16].

При подозрении на БА необходимо выполнить, как минимум, двукратное взятие проб крови для исследования на анаэробную и анаэробную гемокультуру независимо от наличия или отсутствия лихорадки. Посевы крови на гемокультуру дают положительные результаты в 36–50% случаев БА и иногда являются единственным тестом для идентификации возбудителя.

Дифференциально-диагностическая значимость прокальцитонинового теста при септических и асептических артритах окончательно не определена. В частности, повышенное значение данного теста в сыворотке крови больных острым артритом может привести к мысли о развитии БА, но, что более важно, при нормальных показателях последний не может с уверенностью быть исключен.

Идентификация бактериальной ДНК в СЖ методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) открывает перспективы для улучшения этиологической диагностики БА, особенно при инфекциях, вызванных привередливыми или редкими патогенами, включая *K. kingae*, *Streptococcus* spp., микоплазмы и анаэробные бактерии. К другим преимуществам ПЦР относят быстрое получение результатов, высокие отрицательные прогностические значения и большую вероятность выявления патогена у пациентов, которые ранее получали антибиотики. Ограничения ПЦР включают ложноположительные тесты в результате загрязнения образца, отсутствие данных о чувствительности к противомикробным препаратам и, в случае ПЦР широкого спектра действия, трудности с подтверждением конкретного вида из-за общих участков

бактериальной 16S ДНК. Многоцентровая оценка мультиплексной ПЦР для определения наличия бактериальных патогенов в синовиальной жидкости продолжается, и первые результаты являются многообещающими [17].

Предположение о гонококковой этиологии артрита диктует необходимость культурального исследования отделяемого из уретры (у мужчин) или шейки матки (у женщин). Посевы требуется выполнить на селективные среды с добавлением антибиотиков (среда Тайера–Мартина) для подавления сапрофитной флоры. При наличии ГИ однократный посев даёт положительный результат в 80–90% случаев. Всех больных ГИ целесообразно обследовать на наличие заболеваний, передающихся половым путем (хламидиоз, сифилис, ВИЧ-инфекция и др.) для исключения ассоциированной инфекции.

Одним из первоочередных диагностических мероприятий является рентгенография сустава, которая выполняется для исключения сопутствующего остеомиелита и планирования дальнейшей тактики курации больного. Однако отчетливые изменения на рентгенограммах при БА (остеопороз, сужение суставной щели, краевые эрозии) появляются примерно на 2-й неделе от начала заболевания.

Методы радиоизотопного сканирования с технием, галлием или индием позволяют выявить изменения, присущие БА, на ранних стадиях процесса, т. е. в течение первых двух суток. Эти методики особенно важны в тех случаях, когда исследуемый сустав располагается глубоко в тканях или труднодоступен для пальпации (тазобедренные, крестцово-подвздошные).

При компьютерной томографии деструктивные изменения костной ткани выявляются значительно раньше, чем на обзорных рентгенограммах. Данный метод наиболее информативен в случаях поражении крестцово-подвздошных и грудноключичных сочленений.

Магнитно-резонансное исследование позволяет выявить на ранних стадиях заболевания отёк мягких тканей и выпот в полость сустава, а также остеомиелит.

В случаях БА, вызванного *S. aureus*, нетипичными оральными стрептококками — *S. gallolyticus* или *E. faecalis*, рекомендуется выполнить Допплер-эхокардиографию для исключения инфекционного эндокардита [18].

Единых общепринятых диагностических критериев для БА в настоящее время не существует.

## Дифференциальный диагноз

Дифференциальную диагностику БА надо проводить со следующими заболеваниями, проявляющимися острым моноартритом:



- подагрический артрит;
- пиропфосфатная артропатия (псевдоподагра);
- РА (моноартикулярный дебют);
- вирусные инфекции (краснуха, гепатит В, парвовирус В 19);
- Лайм-боррелиоз;
- реактивные артриты.

Необходимо отметить, что инфекция сустава является одной из немногих неотложных ситуаций в ревматологии, требующей быстрой диагностики и интенсивного лечения, что позволяет избежать необратимых структурных изменений. Поэтому абсолютное большинство экспертов полагают, что «золотой стандарт» в ранней диагностике БА — это высокая настороженность врача, который должен расценивать каждый острый моноартрит как инфекционный, пока не доказано обратное.

## Лечение

Лечение БА — комплексное, включающее антимикробную и симптоматическую терапию, дренаж инфицированной СЖ и лечебную физкультуру.

Антимикробную терапию проводят в течение первых 1–2 суток эмпирически с учётом возраста больного, клинической картины заболевания, результатов исследования мазков СЖ по Граму, а также факторов риска наличия резистентной микрофлоры. В дальнейшем проводится (при необходимости) коррекция терапевтической схемы с учётом выделенного возбудителя и его чувствительности к антибиотикам (табл. 2, 3). Антибиотики следует вводить преимущественно парентерально, внутрисуставное их применение нецелесообразно.

Отсутствие положительной динамики через 2 сут диктует необходимость смены антибиотика. Внутривенное введение препаратов рекомендуется в течение 1–2 нед. с последующим 2–4-недельным приёмом внутрь. Выбор перорального антибиотика основывается на его активности *in vitro*, биодоступности и способности проникать в синовиальную жидкость (табл. 4). В целом средние сроки лечения составляют 3–4 нед., но не менее 2 нед. после ликвидации всех признаков заболевания. Сохраняющаяся ускоренная СОЭ служит показанием к продлению сроков лечения. Из-за высокой вероятности сопутствующего остеомиелита при поражении грудино-реберных и крестцово-подвздошных сочленений длительность антибактериальной терапии у этих пациентов увеличивают до 6 нед. [19]. При отсутствии верификации возбудителя, несмотря на повторные микробиологические исследования, продолжают внутривенное введение препаратов, у таких больных переход на пероральный приём не рекомендуется.

Одним из диагностических признаков ДГИ в прошлом считалось значительное улучшение самочувствия больного после назначения пенициллинов. Однако эти средства для лечения гонококковых инфекций в настоящее время не применяются в связи с нарастающим количеством пенициллинорезистентных штаммов *N.gonorrhoeae*.

Антибиотиками выбора для лечения гонококкового артрита являются цефалоспорины III поколения — цефтриаксон (1–2 г/сут в/в) или цефотаксим (3 г/сут в 3 введения в/в), назначаемые в течение 7–10 дней. В дальнейшем проводится пероральная терапия ципрофлоксацином (1000 мг/сут в 2 приёма) или офлоксацином (800 мг/сут в 2 приёма). У лиц моложе 18 лет и у больных с непереносимостью фторхинолонов назначают цефиксим (800 мг/сут внутрь в 2 приёма). Сроки антибактериальной терапии гонококкового артрита должны составлять также не менее 2 нед. после ликвидации всех признаков заболевания. Учитывая большую вероятность сопутствующей хламидийной инфекции, вышеуказанные схемы лечения следует дополнить приёмом азитромицина (1 г внутрь однократно) или доксициклина (200 мг/сут внутрь в 2 приёма в течение 7 дней).

Наряду с антимикробной терапией назначают анальгетики и нестероидные противовоспалительные препараты (диклофенак, кетопрофен, нимесулид, мелоксикам и др.)

Дренаж инфицированного сустава производят (иногда по несколько раз в день) методом закрытой аспирации через иглу. С целью оценки эффективности лечения каждый раз выполняют подсчёт лейкоцитов, окрашивание по Граму и посеvy СЖ. Открытое хирургическое дренирование инфицированного сустава осуществляют при наличии следующих показаний:

- инфицирование тазобедренного и, возможно, плечевого сустава;
- остеомиелит позвонков, сопровождающийся сдавлением спинного мозга;
- анатомические особенности, затрудняющие дренирование сустава (например, грудиноключичное сочленение);
- невозможность удаления гноя при закрытом дренировании через иглу из-за повышенной вязкости содержимого или спаечного процесса в полости сустава;
- неэффективность закрытой аспирации (персистенция возбудителя или отсутствие снижения лейкоцитоза в синовиальной жидкости);
- сопутствующий остеомиелит, требующий проведения хирургического дренирования;
- артрит, развившийся вследствие попадания инородного тела в суставную полость
- позднее начало терапии (более 7 дней).

В течение первых двух суток сустав иммобилизуют. Начиная с 3-го дня болезни, осуществ-

**Таблица 2. Эмпирическая антибактериальная терапия БА [сводные данные]**  
**Table 2. Empirical antibacterial therapy of BA [consolidate data]**

Категории больных	Схемы лечения <sup>1</sup>
Новорождённые до 3 мес.	а) оксациллин 25 мг/кг/сут в 4 введения плюс гентамицин 2,5 мг/кг 3 р/сут; б) оксациллин 25 мг/кг/сут в 4 введения плюс цефотаксим 50 мг/кг каждые 6 ч. или цефтриаксон 50 мг/кг/сут в) цефуроксим 150 мг/кг/сут в 3 введения
Дети до 14 лет	а) оксациллин 50–100 мг/кг/сут в 4 введения плюс цефтриаксон 80 мг/кг, но не более 2 г/сут б) при высокой вероятности MRSA <sup>2</sup> : ванкомицин <sup>3</sup> 40 мг/кг в 2 введения, но не более 2 г/сут
<b>Взрослые и дети старше 14 лет (лечение назначают, исходя из результатов окрашивания по Граму):</b>	
а) гроздьевидные колонии грамположительных кокков (вероятно — стафилококки)	а) оксациллин 2 г 4–6 р/сут; б) цефазолин 2 г 3 р/сут в) при высокой вероятности MRSA <sup>2</sup> : — ванкомицин <sup>3</sup> 1 г 2 р/сут — тейкопланин 0,4 г 2 р/сут в течение 3 дней, затем 0,4 г 1 р/сут — линезолид 0,6 г 2 р/сут — цефтаролин 0,6 г 2–3 р/сут — цефтобипрол 0,5 г 3 р/сут
б) колонии грамположительных кокков в виде цепочек (вероятно — стрептококки)	а) ампициллин 2 г 4 р/сут б) цефтриаксон 1 г 2 р/сут в) цефотаксим 2 г 3 р/сут
в) грамотрицательные палочки	а) цефтриаксон 1–2 г 2 р/сут б) цефотаксим 2 г 3 р/сут в) при высокой вероятности <i>Paeruginosa</i> <sup>4</sup> или устойчивости к ЦС III <sup>5</sup> : — меропенем 2 г 3 р/сут ± амикацин 15–20 мг/кг 1 р/сут
г) микроорганизмы не определяются	а) ванкомицин 1 г 2 р/сут + меропенем 2 г 3 р/сут

**Примечание.** <sup>1</sup> — все препараты водятся внутривенно или внутримышечно. <sup>2</sup> — факторы риска. MRSA включают: а) предшествующую колонизацию или инфицирование MRSA; б) распространённость MRSA ≥10% в регионе; в) употребление наркотиков внутривенно; г) наличие ≥2 признаков из следующих: 1) поступление из учреждения длительного ухода или госпитализация в стационар неотложной помощи за последние 3 мес.; 2) хроническая почечная недостаточность; 3) лечение цефалоспоридами III генерации или фторхинолонами в течение последних 3 мес. <sup>3</sup> — вводить внутривенно медленно (!) в течение 60–120 мин; <sup>4</sup> — факторы риска *Paeruginosa* включают: 1) тяжёлую иммуносупрессию; 2) лиц, употребляющих наркотики внутривенно; 3) предшествующую терапию антибиотиками в течение последних 3 мес.; 4) предшествующую инфекцию или колонизацию данным возбудителем. <sup>5</sup> — в регионах с низкой распространённостью резистентности к цефалоспоридам третьего поколения потенциальными альтернативами меропенему являются пиперациллин/тазобактам 4 г 4 р/сут или цефтазидим 2 г 3 р/сут или цефепим 2 г 3 р/сут.

**Note.** <sup>1</sup> — all drugs are administered intravenously or intramuscularly. <sup>2</sup> — risk factors. MRSA include: a) previous colonization or infection with MRSA; b) prevalence of MRSA ≥10% in the region; c) intravenous drug use; d) presence of ≥2 signs of the following: 1) admission from a long-term care facility or hospitalization in an emergency hospital for the last 3 months; 2) chronic renal failure; 3) treatment with third generation cephalosporins or fluoroquinolones for the last 3 months. <sup>3</sup> — intravenously administered slowly (!) for 60–120 minutes; <sup>4</sup> — Risk factors for *Paeruginosa* include: 1) severe immunosuppression, 2) intravenous drug users, 3) previous antibacterial therapy in the last 3 months, 4) previous infection or colonization with this pathogen. <sup>5</sup> — in regions with a low prevalence of resistance to third-generation cephalosporins, potential alternatives to meropenem are piperacillin/tazobactam 4 g 4 time a day or ceftazidim 2 g 3 time a day or cefepim 2 g 3 time a day.

**Таблица 3. Этиотропная антимикробная терапия БА [сводные данные]**  
**Table 3. Etiotropic antibacterial therapy of BA [consolidate data]**

Возбудитель	Препараты 1 ряда	Альтернативные препараты
MSSA*	Оксациллин или цефазолин	Клиндамицин
MRSA	Ванкомицин	Линезолид
Стрептококки	Ампициллин ± аминогликозид	Ванкомицин или линезолид
Грамотрицательные палочки (кроме <i>Paeruginosa</i> )	Цефтриаксон или цефотаксим	Фторхинолоны
<i>Paeruginosa</i>	Цефтазидим или цефепим	Меропенем
Анаэробы	Метронидазол	Клиндамицин или ампициллин/сульбактам

**Примечание.** \* — метициллиночувствительный *S.aureus*.

**Note.** \* — MRSA.

**Таблица 4. Этиотропная пероральная антимикробная терапия [сводные данные]**  
**Table 4. Oral antibacterial therapy [consolidate data]**

Микроорганизм	Пероральный антибиотик
<i>S. aureus</i>	Амоксициллин/клавуланат 875/125 мг 3 р/сут Левифлоксацин 500–750 мг 1 р/сут Моксифлоксацин 400 мг 1 р/сут Линезолид <sup>1</sup> 600 мг 2 р/сут Клиндамицин 600 мг 3 р/сут
<i>Streptococcus spp.</i>	Амоксициллин 1 г 3 р/сут Цефалексин 1 г 3 р/сут Клиндамицин 600 мг 3 р/сут
Грамотрицательные возбудители	Ципрофлоксацин 500–750 мг/сут Амоксициллин/клавуланат 875/125 мг 3 р/сут Цефиксим 400 мг 1–2 р/сут

**Примечание.** <sup>1</sup> — в течение более чем 2-недельного лечения линезолидом необходим тщательный контроль за наиболее важными нежелательными явлениями (желудочно-кишечные расстройства, усталость, анемия и тромбоцитопения).

**Note.** <sup>1</sup> — during more than 2 weeks of treatment with linezolid, careful monitoring of the most important adverse events (gastrointestinal disorders, fatigue, anemia and thrombocytopenia) is necessary.

ляют пассивные движения в суставе. К нагрузкам и/или активным движениям в суставе переходят после исчезновения артралгии.

## Прогноз

Прогноз — благоприятный при отсутствии серьёзных фоновых заболеваний и своевременной адекватной антибиотикотерапии. В противном случае возникает необратимая утрата функции сустава, которая развивается у 25–50% больных. По данным логистического регрессионного анализа, выполненного испанскими исследователями, факторами риска неудач в лечении БА являются *S. aureus*-инфекция (относительный риск — ОР 2,39;  $p=0,013$ ), развитие эндокардита как осложнения (ОР 4;74,  $p=0,029$ ), поражение суставов, проблемных для дренирования путём игольной аспирации (ОР 2,33;  $p=0,034$ ). Летальность при БА повышается у лиц старших возрастных категорий (ОР 1,27;  $p=0,005$ ), при наличии бактериемии (ОР 27,66;  $p=0,03$ ), сахарного диабета (ОР 15,33;  $p=0,027$ )

и хронической почечной недостаточности (ОР 81,27;  $p=0,007$ ) [20]. Частота летальных исходов при БА существенно не изменилась за последние 25 лет и составляет 5–15%.

### Дополнительная информация

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

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

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

## Литература/References

1. Ravn C., Neyt J., Benito N. et al. Guideline for management of septic arthritis in native joints (SANJO). *J Bone Jt Infect.* 2023 Jan 12; 8 (1): 29–37. doi: 10.5194/jbji-8-29-2023.
2. Cook PP, Siraj D.S. Bacterial arthritis. In: G.S.Firestein, R.C.Budd, S.E.Gabriel, I.McInnes, J.R.O'Dell (ed.). *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology.* 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2017; 1876–1890.
3. Ohl CA. Infectious arthritis of native joints. In: J.E.Bennet, R.Dolin, M.J.Blaser (ed.). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2019; 1400–1417.
4. McBride S., Mowbray J., Caughey W. et al. Epidemiology, management, and outcomes of large and small native joint septic arthritis in adults. *Clin Infect Dis.* 2020;70 (2): 271–279. doi: 10.1093/cid/ciz265.
5. Colavite P.M., Sartori A. Septic arthritis: immunopathogenesis, experimental models and therapy. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014; 20:19. doi: 10.1186/1678-9199-20-19.
6. Wang D.A., Tambyah P.A. Septic arthritis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2015; 29 (2): 275–289. doi: 10.1016/j.berh.2015.05.008.
7. Maki D.G. Risk for septic arthritis was increased in adults with incident diagnosis of gout. *Ann Intern Med.* 2015; 163 (12): JC12. doi: 10.7326/ACPJC-2015-163-12-012.
8. Lim S.Y., Lu N., Choi H.K. Septic arthritis in gout patients: a population-based cohort study. *Rheumatology (Oxford).* 2015; 54 (11): 2095–2099. doi: 10.1093/rheumatology/kev236.
9. Galloway J.B., Hyrich K.L., Mercer L.K. et al. Risk of septic arthritis in patients with rheumatoid arthritis and the effect of anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70 (10): 1810–1814. doi: 10.1136/ard.2011.152769.
10. Lipatov K.V., Asatryan A., Melkonyan G. et al. Septic arthritis of the hand: Current issues of etiology, pathogenesis, diagnosis, treatment. *World J Orthop.* 2022; 13 (7): 622–630. doi: 10.5312/wjo.v13.i7.622.

11. *Bardin T.* Gonococcal arthritis. *Best Pract. Res Clin Rheumatol.* 2003; 17 (2): 201–208. doi: 10.1016/s1521-6942(02)00125-0.
12. *Cucurull E., Espinosa L.R.* Gonococcal arthritis. *Rheum Dis Clin North America.* 1998; 24: 305–322. doi: 10.1016/s0889-857x(05)70011-9.
13. *Margaretten M.E., Kohlwes J., Moore D., Bent S.* Does this adult patient have septic arthritis? *JAMA.* 2007; 297 (13): 1478–1488. doi: 10.1001/jama.297.13.1478.
14. *Richebé P., Coiffier G., Guggenbuhl P. et al.* Management and outcome of native joint septic arthritis: a nationwide survey in French rheumatology departments, 2016–2017 *Ann Rheum Dis.* 2022 Jul 12: annrheumdis-2022-222143. doi: 10.1136/ard-2022-222143.
15. *Fowler M.L., Zhu C., Byrne K., Lieber S.B., Moore A., Shmerling R.H., Paz Z.* Pathogen or contaminant? Distinguishing true infection from synovial fluid culture contamination in patients with suspected septic arthritis. *Infection.* 2017;45 (6): 825–830. doi: 10.1007/s15010-017-1051-y.
16. *Imhoff F.B., Bauer D.E., Uckay I.* Native Joint Arthritis in Adults. In: *W.Zimmerly (ed.). Bone and Joint Infection.* John Wiley & Sons Ltd. 2021; 139–150.
17. *Pons B., Jay C., Marti T. et al.* Identification of pathogens in synovial fluid samples with an automated multiplexed molecular detection system. *Open Forum Infect Dis.* 2018; 5: S678–S679. doi: 10.1093/ofid/ofy210.1943.
18. *Couderc M., Bart G., Coiffier G. et al.* 2020 French recommendations on the management of septic arthritis in an adult native joint. *Joint Bone Spine.* 2020; 87 (6): 538–547. doi: 10.1016/j.jbspin.2020.07.012.
19. *Ross J.J.* Septic arthritis of native joints. *Infect Dis Clin North Am.* 2017; 31 (2): 203–218. doi: 10.1016/j.idc.2017.01.001.
20. *Maneiro J.R., Souto A., Cervantes E.C. et al.* Predictors of treatment failure and mortality in native septic arthritis. *Clin Rheumatol.* 2015 Nov; 34 (11): 1961–1967. doi: 10.1007/s10067-014-2844-3.

## Информация об авторах

*Белов Борис Сергеевич* — д. м. н., заведующий лабораторией коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-7091-2054. ResearcherID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN-код: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

*Муравьева Наталья Валерьевна* — к. м. н., научный сотрудник лаборатории коморбидных инфекций и вакцинопрофилактики, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой», Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-4327-6720. ResearcherID: AAF-4853-2021. eLIBRARY SPIN-код: 8418-4469. Scopus Author ID: 57210263706

## About the authors

*Boris S. Belov* — D. Sc. in Medicine, Head of the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccinoprophylaxis, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-7091-2054. ResearcherID: ABD-2219-2020. eLIBRARY SPIN: 3298-4315. Scopus Author ID: 7004592537

*Natalia V. Muravyeva* — Ph. D. in Medicine, Researcher at the Laboratory of Comorbid Infections and Vaccine Prevention, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-4327-6720. Researcher ID: AAF-4853-2021. eLIBRARY SPIN: 8418-4469. Scopus Author ID: 57210263706

**Памяти Н. Н. Клишко**  
**22 марта 1956 г. — 30 марта 2023 г.**

**In Memory of N. N. Klimko**  
**22 March 1956 — 30 March 2023**

---

30.03.2023 г. на 68 году жизни скоропостижно скончался доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии — высококлассный профессионал, прекрасный врач и педагог Николай Николаевич Клишко.

Н. Н. Клишко окончил Военно-медицинскую академию в Санкт-Петербурге и прошёл в ней все ступени клинического становления от адъюнкта до заместителя начальника кафедры гематологии и клинической иммунологии. В 1997 г. он защитил докторскую диссертацию на тему «Роль цитокиновой и эндокринной систем в регуляции метаболических проявлений бактериальных осложнений острых лейкозов».

В 1998 г. Николай Николаевич становится заведующим кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. Приоритетной сферой научно-практических интересов профессора Н. Н. Клишко на многие годы стала клиническая микология.

Будучи широко образованным и эрудированным, профессор Н.Н. Клишко являлся выдающимся клиницистом, чрезвычайно работоспособным и энергичным. Всегда корректный, элегантный, требовательный к сотрудникам и помощникам, он был внимателен к больным и коллегам по работе. Его отличали острый ум и принципиальность. Благодаря своему профессионализму, энциклопедическим знаниям, целеустремленности и принципиальности Николай Николаевич пользовался у коллег заслуженным авторитетом и уважением.

Блестящий лектор, учёный, педагог — он стал наставником для целого поколения учеников, создав научную школу по клинической микологии международного уровня. Николай Николаевич написал множество научных работ и стал автором большого количества статей, принимал участие в более чем 20 научных исследованиях препаратов у пациентов с аллергическими проявлениями. За время своей профессиональной деятельности он подготовил огромное количество высококвалифицированных специалистов.

Николай Николаевич был настоящий подвижник, умный и добрый, делавший свою работу с бесконечной энергией, оптимизмом и любовью к людям. Сейчас его коллеги пишут о невосполнимой потере для российской и мировой медицины. Как врача, консультирующего и спасающего



пациентов с тяжёлыми инвазивными микозами, его знали и с надеждой ждали во всех стационарах Санкт-Петербурга и России.

Ежедневное общение с ним приносило не только позитив, радость и заряд энергии, но и помогало каждому обогатить себя его бесценным опытом — клинического миколога и которым он щедро делился со всеми. Каждый клинический разбор под его руководством — это эксклюзивный мастер-класс.

Профессор Н. Н. Клишко был членом Европейской конфедерации медицинских микологов (ECMM), «The International Society for Infectious Diseases», «European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing» (EUCAST), «European Hematology Association» (EHA), «European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases» (ESCMID), Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАК-МАХ). Он активно сотрудничал с Международным фондом по борьбе с грибковыми инфекциями и был признанным экспертом в нашей стране и за рубежом. Имел награды и знаки воинского отличия, был членом редакционных коллегий журналов «Проблемы медицинской микологии», «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия», «Антибиотики и химиотерапия», «Журнал инфектологии», «Journal of Fungi».

Светлая память о Николае Николаевиче навсегда останется в сердцах знавших его людей, а его имя — в истории медицинской микологии!

*Редколлегия, редакционный совет и редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия» выражают глубокое соболезнование родным и близким Николая Николаевича Клишко и вместе с ними скорбит о его безвременной кончине.*